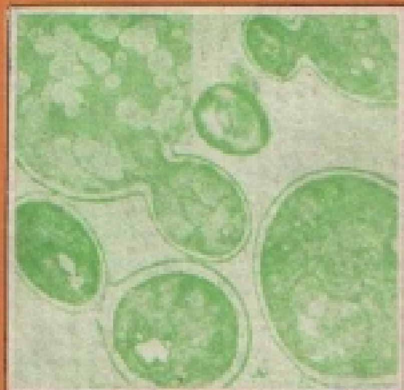
I. ANGHEL A. VAMANU

LILIANA MITRACHE C. STANCIU O. ARIZAN
G. POPA G. ROŞMARIN MARIA CERCEL
CRISTINA POPA MARIA HERCZEGH RODICA ARIZAN



vol. 3

BIOLOGIA ŞI TEHNOLOGIA DROJDIILOR

Editura Tehnică

CUVÂNT ÎNAINTE

Asigurarea hranei pentru cele 6 miliarde de oameni, cît se estimează că vor trăi pe TERRA în anii 2000, reclamă de pe acum elaborarea unor proiecte concrete pe baza cărora să se stabilească o politică alimentară adecvată. Conferința Mondială a Națiunilor Unite pentru Alimentație (1974) a arătat că la începutul anilor 1970 peste 460 000 000 — 5000 000 000 de oameni, din care 40% copii, sufereau de foamete permanentă, iar numărul lor este în continuă creștere. La aceștia se adaugă circa 1 miliard de subnutriți. În cadrul Conferinței se estima că, în anul 1985, în condițiile unei producții mondiale de 900 milioane tone cereale, deficitul va fi de aproximativ 85 milioane tone. Hrana populației depinde în cea mai mare proporție de cei 14—15 milioane km² de teren utilizat în scopuri agricole.

Se apreciază că ecosistemele cultivate și exploatate asigură omenirii peste 90% din energia consumată sub formă de alimente, iar contribuția oceanului mondial este de circa 2%. În același timp activitatea umană determină o reducere substanțială a suprafeței de teren arabil. Statisticele U.N.E.P. arată că suprafața totală a solurilor distruse și degradate, cîndva productive, se ridică la 20 000 000 km², mai mult decît terenul arabil folosit pentru agricultură în prezent. Pierderile de pămînt pentru agricultură au loc datorită urbanizării, industrializării, eroziunii, salinizării, deșertificării sau altor cauze.

Studiile de prognoză au arătat că deși au fost create condiții pentru înregistrarea unui randament ridicat în producția de cereale, aceasta crește pe plan mondial numai cu 2,6%, în timp ce necesitățile pentru alimentația oamenilor, estimate în raport cu datele demografice și cererile de nutrețuri pentru hrana animalelor reprezintă o creștere de 3,3—3,4%.

Deficitul de alimente resimțit în urma unor calamități naturale sau conflicte armate a condus la găsirea unor noi modalități de obținere a proteinelor. Astfel, în primul război mondial, în timpul căruia Germania a înregistrat un deficit de alimente, a apărut ideea obținerii proteinelor alimentare prin cultivarea speciei Saccharomyces cerevisiae. Ulterior au fost folosite și alte specii de drojdii [Candida arborea, C. utilis, Saccharomyces (Candida) lipolytica etc.]. Saccharomyces (Candida) lipolytica, de exemplu, este capabilă să oxideze hidrocarburile la acizi grași care, ulterior, sînt convertiți în substanțe celulare cu un conținut în proteine de aproximativ 50%. În același timp se realizează o deparafinare de 10—25% a substratului (petrolul). În prezent se folosește un mare număr de specii ce aparțin la genurile Saccharomyces, Candida, Debaryomyces, Hansenula, Pichia, Rhodotorula, Endomyces, Loddermyces, Mitschnikowia, Schwanniomyces, Wingea, Torulopsia ș.a., ce se cultivă pe medii din cele mai variate (melasă, borhot, n-parafine, metanol, etanol), din care unele, cum sînt leșiile bisulfitice și hidrolizatele din lemn, erau inutilizabile și în multe cazuri poluante.

În afara faptului că drojdiile valorifică diverse medii de cultură ieftine, extinderea producerii proteinelor prin folosirea drojdiilor se datorește și randamentului foarte ridicat al creșterii în comparație cu sursele tradiționale. De pildă bovinele în greutate de 500 kg au în 24 ore o creștere echivalentă cu 400—500 g de proteină, iar o cantitate echivalentă de celule de drojdii (500 kg) produce în același timp 80 t de proteine (~40—50% din biomasa totală; Sasson, 1983).

Deși suprafața totală a țării noastre și măsurile deja luate pentru sprijinirea agriculturii și stimularea țărănimii vor putea asigura hrana pentru o populație cel puțin dublă față de cea de 23 milioane cît numără în prezent populația țării noastre, s-au inițiat ample programe de construire de secții sau fabrici care deja produc proteine și alte substanțe biologic-active prin cultivarea bacteriilor și drojdiilor pe medii relativ ieftine și disponibile în cantitate suficientă, cum sînt leșiile bisulfitice și hidrolizatele din lemn, n-*parafina, alcoolul metilic, alcoolul etilic, borhotul, melasa de sfeclă, zerul din industria laptelui, grăsimile reziduale din abatoare etc.*

În paralel s-au inițiat cercetări pentru ameliorarea tulpinilor de drojdii izolate din natură sau care se folosesc în mod curent în producție prin tehnici de mutageneză și inginerie genetică. Amintim în acest sens preocupările și rezultatele promițătoare ale laboratorului de Genetica Microorganismelor, din cadrul facultății de Biologie din București care, acumulînd o bogată experiență în studiul geneticii drojdiilor, a inițiat primele cercetări în domeniul geneticii drojdiilor industriale. În colaborare cu Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice București și Institutul de Energetică Chimică și Biochimică din I.C.E.C.H.I.M. București, laboratorul nostru a obținut mai multe linii și hibrizi producătoare de biomasă proteică, alcool, ergosterol, care se caracterizează prin valorificarea mai eficientă a mediilor de cultură și randamentul productiv ridicat, în comparație cu tulpinile ce se folosesc în producție.

Volumul III din Biologia și tehnologia drojdiilor *este elaborat de specialiști care își desfășoară activitatea în învățămîntul superior și în institutele de cercetare și proiectare, ceea ce se răsfrînge pozitiv asupra conținutului, uneori inedit al problemelor dezbătute. În lucrare sînt prezentate sintetic experiența și rezultatele obținute de specialiștii români, inclusiv ale autorilor volumului, în domeniul tehnologiei obținerii proteinelor prin cultivarea drojdiilor pe diverse medii de cultură (leșii bisulfitice din lemn, metanol, etanol,* n-*parafine etc.). Prin publicarea acestei lucrări specialiștii din cercetare, proiectare și producție (ingineri, chimiști, biologi) vor beneficia de un ghid prețios pentru informare și documentare, dar și pentru activitatea practică de producție.*

Scrisă pe baza unei temeinice documentări și a unor îndelungate experimente proprii, lucrarea este utilă studenților din învățămîntul superior biologic și biochimic și cercetărilor din laboratoarele cu profil de microbiologie și biotehnologie.

Ne exprimăm și de această dată speranța că noul volum din Biologia și tehnologia drojdiilor *va constitui o lucrare de referință în literatura de specialitate și un sprijin direct și calificat în activitatea de cercetare și producție.*

Exprimăm cele mai alese și respectuoase mulțumiri prof. dr. C. Voica pentru amabilitatea și promptitudinea cu care a acceptat să analizeze conținutul lucrării și pentru sugestiile făcute în vederea definitivării pentru tipar.

Întreaga noastră gratitudine și sincere mulțumiri Editurii Tehnice (redactor ing. Olga Stoian) pentru sprijinul acordat în vederea apariției lucrării noastre.

Prof. dr. **I. ANGHEL**

INTRODUCTION

The provision of the food for those 6 billion men, foreseen to live on Terra in the years 2 000, requires to establish, beginning from now, concrete plans as a base for a suitable alimentation policy. The World Conference of the United Nations for Alimentation (1974) has revealed that at the beginning of the years 1970 over 460 000 000—500 000 000 men, among whom 40% children, were suffering permanently from hunger, and this number is continually increasing. To these one must add about one billion of people suffering from subnutrition. At the conference it has been estimated that in the year 1985, presuming a global production of 900 million tons of cereals, the deficit will be of approx .85 million tons. The nutrition of tne worlds population depends for the major part on those 10—11% (14—15 million km^2) of land used for agricultural purposes.

It is estimated that the cultivated and exploited ecosystems warrant mankind over 90% of the energy consumed in the form of food, while the contribution of the global ocean amounts to ca. 2%. At the same time human activities lead to a substantial reduction of the surface area of arable land. The UNEP statistics show that the total surface of destroyed and depreciated soil — once productive — amounts to 20 000 000 km^2, more than the arable land used for agriculture at present. The losses of agricultural land are due to urbanization, industrialization, erosion, salting, desertification and to other causes.

Prognostic studies have shown that although there were created conditions for enhancegn the production of cereals, this grows on a global scale only by 2,6%, whereas the needs for the nourishment of mankind, evaluated on the base of demographic data and the demand for animal fodder grow by 3,3—3,4%.

The deficit of foodstuff registered as a consequence of natural calamities or hte waging of wars led to the discovery of new ways to obtain proteins. Thus, during The First World War, when in Germany there was a deficit of food, the idea arose to gain food-proteins by cultivating the species *Saccharomyces cerevisiae*. Later on other species of yeasts were used also (*Candida arborea, C. utilis, Saccharomyces (Candida) lipolytica* etc. *Saccharomyces (Candida) lipolytica* e.g. is capable to oxidize hydrocarbons to fatty acids, which are converted to cellular substances with a content of approx. 50% proteins. At the same time a 10—25% dewaxing of the substrate (raw oil) is obtained. At present a great number of species are used, belonging the genera: *Saccharomyces, Candida, Debaryomyces, Endomycopsis, Hansenula, Pichia, Rhodotorula, Wingea, Torulopsis* a.o., cultivated on various media (melasses, fermentation residues *n*-paraffins, ethanol, methanol) some, as the bisulphitic lye and the wood hydrolysates being useless and in many cases polluant.

Besides the fact that yeasts utilise various cheap culture media, the extension of protein production by means of the yeasts, is due also to the high yield of their culture compared with the traditional sources. For example cattle at the weight of 500 kg offer in 24 hours an increase equivalent to 400—500 g protein, while the equivalent quantity of yeast cells (500 kg) produces during the same lapse of time 80 tons protein (40—50% of the total biomass; Sasson, 1983)

Although the total surface area of our country and the measures already taken for the support of the agriculture and the stimulation of the peasantry will provide the food for a population at least the double of the present 23 million people of our country's population, comprehensive programms have been initiated to construct workshops and plants which already produce proteins and other biologically active substances by the cultivation of bacteria and yeasts on relative unexpensive media, available in sufficient qantities, as are bisulphitice lye and wood hydrolysate, *n*-paraffins, methanol, ethanol, fermentation residues, sugar-beet melasses, dairy whey, residual fat from slaughter-houses etc.

In parallel were initiated researches in view of the improvement of yeast strains, isolated from nature or which are utilised currently in production, applying the techniques of mutagentsis and genetic engineering. In this connection we remind the endeavours and promising results won by the Laboratory of Microorganism Genetics of the Biology faculty in Bucharest; this laboratory has accumulated a large experience in the study of the genetics of yeasts and has started the research in the domain on the genetics of industrial yeasts. Collaborating with the Institute for Chemical-Pharmaceutical Research in Bucharest and the Institute for Chemical Energetics and Biochemistry of ICECHIM-București, our laboratory has obtained a number of strains and hybrids producing protein biomass, alcohol and ergosterol, characterised by a higher efficiency in the utilization of culture media and by the better production yield, compared to the strains actually used in industry.

Volume III of *Biology and technology of yeasts* is written by experts who are working in High Schools and Institutes for Research and Development; that is reflected positively by the content and the sometimes altogether new outlook on the problems under discussion. In the work are presented synthetically the experience and the results obtained by romanian scientists, comprising also the authors of the volume, in the domain of the production technology of proteins by cultivation of yeasts on various culture media (bisulphitic lye, wood-hydrolysate, methanol, ethanol, *n*-paraffins etc.). By the publication of this work the specialists in research, design and production (engineers, chemists, biologists) will benefit from a valuable guide to information and documentation, and also to the practical activity in industry.

Written on the base of a thorough documentation and years of personal experience, the work is useful for students of high school, from the faculties of biology and biochemistry, and also for research-wokers in laboratories specialized in microbiology and biotechnology.

We express once more our hope that this new volume of the „*Biology and technology of yeasts* will represent a basic book of reference as part of the special literature and will be of immediate and qualified help in the activities of research and production.

We give expression to our profound and respectful gratitude towards Prof. dr. *C. Voica* for his friendly and prompt readiness to analyze the content of the work and for his suggestions made in view of the final editing.

We present also our sincere thanks to the publisher — Editura Tehnică — and to editor Ing. Olga Stoian, for the assistance granted in view of the apparition of our work.

Prof. dr. **I. ANGHEL**

CUPRINS

BIOLOGY AND TECHNOLOGY OF YEASTS

CONTENTS

IIIrd Vol., 1993

INTRODUCTION

IInd Vol., 1991

Ist Vol., 1989

1. DROJDIILE — O SURSĂ VALOROASĂ DE PROTEINE ȘI ALTE SUBSTANȚE BIOLOGIC-ACTIVE

I. ANGHEL și LILIANA MITRACHE

Încă din perioada primului război mondial, drojdiile și-au găsit o întrebuințare în alimentația omului, iar între cele două războaie mondiale, producția de drojdii alimentare din Germania a fost de peste 15 000 t anual (Kosaric și Zajic, 1974).

Sînt date care semnalează folosirea drojdiilor încă de pe vremea lui Hippocrates și Plinius cel Bătrîn, pentru tratarea deficiențelor nutritive și au intrat în regimul alimentar al multor popoare, sub formă de alimente și băuturi. Primele studii referitoare la utilizarea drojdiilor în alimentație aparțin lui Delbrück (1875) care a recunoscut valoarea alimentară a celulelor de drojdie și a susținut necesitatea recuperării și utilizării drojdiilor reziduale. S-a constatat că drojdia de bere poate înlocui alte concentrate alimentare în menținerea și ameliorarea creșterii organismului animal, în sporirea cantității de lapte la vaci și a numărului de ouă la găini.

Wiley (1954) apreciază că în Germania în cursul primului război mondial drojdiile au înlocuit peste 60% din concentratele proteice, perioadă în care Delbrück, Hayduck și Wohl au elaborat un program pentru obținerea proteinei din drojdii.

După o perioadă de relativă stagnare în studiul și folosirea drojdiilor în alimentație, anii 1930—1940 înregistrează un mai mare interes, determinat în mare măsură de conținutul relativ ridicat în vitamine din grupul B și rolul acestora în metabolismul uman și animal. În 1934 guvernul german a elaborat un program de cercetare pentru producerea de drojdie din hidrolizate de lemn și leșie sulfitică.

Exploatarea comercială a proteinei de drojdie pentru alimentație și furajarea animalelor s-a dezvoltat rapid în timpul celui de-al doilea război mondial. Aceste rezultate au stimulat interesul pentru dezvoltarea producției de drojdie și în alte țări. În Anglia Thaisen a obținut două tulpini de *Torulopsis utilis*, *T. utilis var thermophila*, capabilă să se dezvolte la temperaturi ridicate, și *C. utilis var major*, cu celule de dimensiuni mai mari. Studii de genetica drojdiilor și pentru utilizarea lor în industria de proteine au fost inițiate și în fosta Uniune Sovietică (1930), Suedia (1939), S.U.A. (1943).

În S.U.A. s-a studiat în mod deosebit folosirea reziduurilor din industria forestieră și a celor rezultate din prelucrarea și industrializarea fructelor și legumelor și reducerea în același timp, cel puțin parțial, a poluării rîurilor și lacurilor.

Una dintre problemele majore ale societății contemporane o constituie criza mondială de alimente și în cadrul acesteia criza de proteine. Este o criză cronică care, în ultima vreme, prezintă tendințe de agravare.

Situația se datorește, pe de o parte, exploziei demografice a populației globului și, pe de altă parte, tendinței de creștere continuă a nivelului mediu de trai al popoarelor.

În momentul de față populația globului a depășit 5 miliarde (5,3 miliarde după estimările O.N.U.) și continuă să crească. Potrivit prognozelor Organizației Națiunilor Unite (O.N.U.), în anul 2000, populația Terrei va ajunge la 6,2 miliarde locuitori, cărora trebuie să li se asigure hrana necesară. Eforturile ce se depun pe plan mondial pentru îmbunătățirea alimentației populației globului sînt însă anihilate sau diminuate în parte de criza de proteine care afectează țările în curs de dezvoltare.

Din datele publicate de F.A.O., consumul mondial de proteine din alimentația umană în 1970 a fost de 91,1 milioane, care raportat la populația de 3,621 miliarde oameni în anul respectiv a prezentat o rație medie zilnică pe cap de locuitor de 68,9 g, valoare apropiată de necesarul minim zilnic care este estimat la 70 g pe cap de locuitor. Din analiza datelor publicate de F.A.O. se constată că în timp ce țările industrializate au beneficiat de o rație medie de proteine de 96,4 g/zi pe cap de locuitor, cele în curs de dezvoltare, care reprezintă peste două treimi din populația globului, au dispus de numai 57,4 g/locuitor și zi. Disproporția dintre țările industrializate și cele în curs de dezvoltare este și mai mare dacă se iau în considerare numai proteinele bogate în aminoacizi esențiali de origine animală sau alte proteine cu o compoziție similară.

Această repartizare inegală a proteinelor de origine animală (în 1970 în țările dezvoltate reveneau 58 kg/an pe locuitor carne și pește, în țările în curs de dezvoltare reveneau unui locuitor numai 19 kg/an) reprezintă una dintre cauzele majore ale foametei și subnutriției care afectează anual circa 700 milioane oameni și cauza principală a stării de subdezvoltare fizică și intelectuală a aproximativ 500 milioane copii.

Se apreciază că anual jumătate din oamenii care mor (30—40 milioane) cad pradă foametei sau maladiilor infecțioase ce afectează organismele slăbite de insuficiența sau calitatea proastă a hranei.

După datele O.M.S. numai 1/5 din populația globului beneficiază de un regim alimentar adecvat.

În estimarea necesarului și consumului de proteine trebuie să se țină seama că la cantitățile folosite direct în alimentația umană se adaugă cele folosite în zootehnie. De exemplu, consumul de cereale în zootehnia țărilor industrializate reprezintă aproape 80% din cantitatea pe care o consumă tot restul lumii pentru alimentația umană. La acest consum de cereale se adaugă o serie de concentrate proteice cum sînt făina de pește, făina de carne și oase, albumina de sînge, lapte praf, șroturile semințelor sau fructelor unor plante oleaginoase (arahide, soia etc.).

În afara unor măsuri care vizează extinderea suprafețelor agricole, dezvoltarea unei agriculturi intensive, introducerea și extinderea în cultură a unor plante bogate în proteine, crearea unor rase de animale de înaltă productivitate și modernizarea zootehniei, dezvoltarea pisciculturii etc., în întreaga lume s-au inițiat ample programe și studii pentru elaborarea unor

tehnologii în scopul obţinerii de proteine prin cultura bacteriilor, algelor şi drojdiilor sau exploatarea unor resurse ale lacurilor, mărilor, oceanelor.

Experienţa acumulată de unele ţări ca Anglia, Cehoslovacia, Franţa Suedia, S.U.A., fosta Uniune Sovietică a dovedit că microorganismele constituie o alternativă de mare importanţă şi perspectivă în rezolvarea problemei hranei omenirii. Proteinele microbiene care prin proprietăţile lor se situează la nivelul celor animale pot fi produse în cantităţi mari, adesea chiar din reziduurile industriale inutilizabile şi uneori poluante.

Microorganismele cele mai frecvent utilizate ca sursă de proteine în nutriţia omului şi animalelor sînt drojdiile. Datele experimentale, din ce în ce mai numeroase, atestă că proteina din drojdie poate înlocui proteinele vegetale şi animale tradiţionale. S-a constatat că drojdiile sînt capabile să sintetizeze vitaminele hidrosolubile din grupa B dar să şi le înmagazineze în celulă în cantităţi la fel de mari sau chiar mai mari decît cele din ţesuturile animale recunoscute ca surse importante de vitamine.

În condiţiile adîncirii crizei alimentare, fabricarea proteinelor de biosinteză reprezintă una dintre căile de perspectivă pentru asigurarea necesarului de proteine.

Tehnologia obţinerii proteinelor de biosinteză prezintă, după B o i a g i a n (date nepublicate), următoarele avantaje :

— permite obţinerea de proteine cu valoare biologică ridicată din materii prime disponibile în cantităţi mari, constituite în mare măsură din subproduse sau deşeuri şi reziduuri industriale ;

— prin utilizarea deşeurilor şi reziduurilor industriale se realizează şi un efect de denocivizare a acestora şi prin aceasta se realizează o îmbunătăţire a condiţiilor de viaţă.

— oferă posibilitatea, în raport cu substratul folosit, obţinerii de proteine cu randament mult mai mare în comparaţie cu cele de origine animală.

Se estimează că pentru obţinerea a 1 g de aliment proteic consumul de hidraţi de carbon este dependent de sursă (tabelul 1).

Tabelul 1

Consumul de hidraţi de carbon pentru producerea unui g aliment proteic

Sursa proteinei	Consumul de hidarţi de carbon în g
Proteină de biosinteză	4—6
Proteină din carne de vită	800—1 200
Proteine din carne de pasăre	1 000—1 500
Proteine din lapte	1 500—2 000

Rata mare de multiplicare a speciilor de microorganisme folosite pentru producerea proteinelor de biosinteză dă posibilitatea ca în unitate de timp să se obţină producţii net superioare faţă de cele pe care le dau plantele şi animalele. De exemplu, o tonă de proteine poate fi produsă în 24 ore, fie de 2 000 de vaci, fie de 360 ha de mazăre, dar numai prin cultivarea a 10 kg drojdii într-o cuvă de fermentaţie cu un volum de circa 100 m³. În comparaţie cu proteinele de origine vegetală, producţia de proteine de biosinteză nu depinde de condiţiile pedoclimatice, întrucît se realizează în fermentatoare industriale, în care compoziţia mediului şi condiţiile de multiplicare (tem-

peratură ; pH etc.) sînt reglate (tabelul 2). Producerea de proteine de biosinteză conduce la importante economii de teren agricol. De pildă 100 tone proteine/an se pot obține ca proteine de biosinteză într-o cuvă de fermentație, cu o capacitate de 400—600 m³, care ocupă o suprafață de 40—50 m³ în timp ce pentru obținerea aceleași cantități de proteine din cereale ar fi necesare în condițiile unei agriculturi mecanizate, irigate și erbicizate, circa 2 500 ha pentru grîu, 1 600 ha pentru porumb și aproximativ 1 000 ha pentru soia.

Tabelul 2

Timpul necesar pentru dublarea greutății prin creșterea unor microorganisme, organisme vegetale și animale

Organismul	Timpul necesar pentru dublarea greutății (ore)
Bacterii și drojdii	0,3—2,0
Alge și mucegaiuri	2,0—6,0
Plante superioare	144,0—288,0
Păsări	288,0—576,0
Porcine	672,0—1 008,0
Bovine	720,0—1 400,0

Pentru menținerea echilibrului azotat al unui organism, nu este suficient ca hrana să conțină o anumită cantitate de proteină, ci este necesar ca acele proteine să aducă în cantități corespunzătoare toți aminoacizii esențiali pe care organismul uman sau animal nu-i poate sintetiza. De pildă, organismul uman nu poate sintetiza aproximativ 50% din aminoacizii care îi sînt necesari pentru procesele de creștere, reparare și menținere a structurilor proprii. Omul trebuie să primească prin hrană 10 aminoacizi esențiali și anume valina, leucina, izoleucina, lizina, arginina, treonina, metionina, fenilalanina, histidina și triptofanul. În lipsa metioninei și fenilalaninei nu pot fi sintetizați alți doi aminoacizi : cisteină și tirozina. În schimb, dintre aminoacizii esențiali arginina și histidina pot eventual lipsi dacă ceilalți sînt administrați în cantități suficiente.

Proteinele de biosinteză se caracterizează printr-o valoare nutritivă ridicată, pe care o conferă conținutul ridicat de proteine (40—60%), vitamine, aminoacizi esențiali, în special lizină și cantitatea de azot care pot fi absorbite și reținute de organism și pot substitui proteinele de origine animală, deficitare și scumpe. Cerealele (grîu, porumb, orez) sînt în general deficitare în lizină, unul din cei mai importanți aminoacizi estențiali și într-o oarecare măsură în triptofan. Soia, la rîndul ei, este deficitară în leucină (tabelul 3). Drojdia furajeră depășește, de asemenea, de cîteva ori furajele de origine vegetală concentrată în privința diversității și cantității vitaminelor din grupa B. Un kilogram drojdie conține 13—18 mg tiamină, 20—50 mg riboflavină, 60—100 mg acid pantotenic, circa 6 000 mg colină, 200—300 mg acid nicotinic. Conținutul în vitamine este cu atît mai important cu cît organismul uman nu poate sintetiza vitaminele liposolubile A, D, E, F (acizii linoleic și linolenic), vitaminele hidrosolubile din complexul B (B_1, B_2, B_5, B_6, B_{10}, B_{11}, B_{12}, B_{15}, PP, colina, betaina), vitamina C, ș.a. (tabelul 4).

Tabelul 3

Conținutul în acizi esențiali al unor proteine microbiene comparativ cu grîul și albușul de ou, în g% proteină brută
(Topală, 1986)

Acizi aminici esențiali	Grîu	Albuș de ou	*Spirulina maxima*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Candida lipolytica* (cultivată pe motorină)	*Candida sp.* (cultivată pe metanol	*Pseudomonas sp.* (cultivată pe metanol)	*Hydrogenomonas eutropha*
Lizină	2,8	6,5	4,6	7,7	7,8	4,91	5,3	8,6
Treonină	2,9	5,1	4,6	4,8	5,4	2,74	4,5	4,5
Metionină —cistină	4,0	5,6	1,8	1,7	2,5	8,11	2,1	2,7
Triptofan	1,1	1,6	1,4	1,0	1,3	—	—	2,7
Izoleucină	3,3	6,7	6,0	4,6	5,3	1,92	3,9	4,6
Leucină	6,7	8,9	8,0	7,0	7,8	4,80	7,0	8,5
Valină	4,4	7,3	6,5	5,3	5,8	1,21	5,9	7,1
Fenilalanină	4,5	5,8	5,0	4,1	4,8	3,99	4,2	4,0

Tabelul 4

Conținutul în vitamine
(Banu, 1987)

Vitamina	Conținutul, mg/100 g	Vitamina	Conținutul mg/100 g
B_1 (tiamina)	1,0—1,5	B_8 (H-biotina)	0,04—0,09
B_2 (riboflavina)	2,5—5,0	BC (acidul folic)	1,8—2
B_3 (PP-nicotin amida)	35—45	B_{12} (cobalamina)	0,0005—0,0015
B_4 (acidul pantotenic)	8—15	Acidul ascorbic	6,5—7,5
B_5 (piridoxină)	0,8—1,2	E (tocoferolul)	25—45

O parte dintre aceste vitamine sînt sintetizate de flora intestinală, dar marea lor majoritate trebuie asigurate prin alimentație. După unele calcule din 1 000 000 t de drojdie furajeră se obțin 9 000 t vitamine și 450 000—500 000 t proteine cu un conținut în aminoacizi esențiali de 220 000 t. Biomasa de drojdii mai conține macro- și microelemente necesare organismului animal și uman (P, Ca, K, Fe, Mg, Na, Co, Mn) (N. Topală 1986).

Calitatea superioară pe care o prezintă proteinele de biosinteză asigură folosirea lor în perspectivă și în alimentația omului. În același timp drojdia furajeră reprezintă o materie primă valoroasă din care prin prelucrare ulterioară poate fi obținută o gamă largă de produse alimentare și farmaceutice.

1.1. MATERII PRIME UTILIZATE ÎN PRODUCȚIA DE PROTEINE

Producerea industrială de drojdii furajere și/sau alimentare se realizează în mare măsură din subproduse sau deșeuri și reziduuri industriale ca : *deșeuri celulozice* — hidrolizate de sulf, paie de grîu, coceni de porumb, coji de floa-

rea-soarelui, rumeguş de lemn, leşii sulfitice ş.a. ; *ape reziduale din industria alimentară* ; *zer* (deşeu de la fabricarea brînzeturilor care conţine ca sursă de carbon lactoza) ; *melasă şi borhot de melase* ; *petrol lampant* ; *motorină* ; *ceară de parafină*, care conţine hidrocarburi saturate aciclice : *n*-alcani sau *n*-parafine ; *metan* ; *alcool metilic* ; *alcool etilic*.

Materia primă utilizată în instalaţiile industriale este selectată în funcţie de o serie de factori, dintre care cei mai importanţi sînt disponibilitatea, costul şi capacitatea de asimilare.

Prin utilizarea deşeurilor şi reziduurilor industriale, în afară de producţia de proteine se realizează şi o reducere cel puţin parţială a poluării rîurilor cu reziduuri.

În aceste materii prime utilizate ca medii de cultură pentru drojdii se găsesc, în anumite cantităţi, o serie de glucide cum sînt : glucoza, xiloza, maltoza, zaharoza, manoza, galactoza, arabinoza, pe care drojdiile le pot folosi ca sursă de carbon şi energie. În majoritatea ţărilor producătoare de proteine de biosinteză se folosesc leşiile bisulfitice rezultate de la fabricarea hîrtiei şi celulozei (S.U.A., Franţa, Germania). În fosta U.R.S.S. se foloseau leşiile bisulfitice şi borhotul de la fabricarea spirtului, iar în Bulgaria, în afara leşiilor bisulfitice rezultate din hidroliza lemnului, se folosesc şi cele obţinute din hidroliza cocenilor de porumb şi cojilor de floarea-soarelui.

La noi în ţară, multe secţii şi fabrici de drojdie furajeră ca de pildă Piteşti, Comăneşti-Bacău, Blaj-Alba, Suceava, Drobeta Turnu-Severin folosesc apele reziduale de la fabricarea plăcilor fibrolemnoase, iar Zărneşti — Braşov, Letea — Bacău, Reconstrucţia — P. Neamţ, folosesc leşiile bisulfitice de la fabricarea celulozei. În cele mai multe cazuri se folosesc mai multe specii din dorinţa ca prin activitatea fiecăreia să se valorifice mai bine mediul de cultură. Zărneşti foloseşte *Candida tropicalis*, *C. arborea*, *C. utilis*, *L. robusta*. Suceava şi Letea Bacău folosesc *Candida robusta* iar Drobeta Turnu-Severin şi Blaj-Alba utilizează o singură specie, *Candida robusta*.

În paralel cu valorificarea şi diversificarea reziduurilor industriale, în ultimii ani s-au întreprins cercetări pentru biosinteza proteinelor pornind de la fracţiuni de hidrocarburi petroliere. Primele cercetări pentru producerea de proteine cu valoare alimentară au fost iniţiate de colectivul condus de cercetătorul francez Champagnat. Ulterior, numeroase ţări au elaborat programe de cercetare şi proiecte de construcţie a unor instalaţii industriale pentru producerea de proteine prin cultivarea drojdiilor pe fracţiuni parafinice (Anglia, Cehoslovacia, China, Franţa, Japonia, India, fosta U.R.S.S., S.U.A.).

În majoritatea cazurilor pentru fiecare tip de hidrocarburi se foloseşte o anumită specie de microorganism. De exemplu *Candida lipolytica* utilizează parafine lineare saturate cu 10—40 atomi de carbon, iar unele bacterii, ca de pildă cele din genul *Pseudomonas*, se dezvoltă bine pe metan, kerusen sau naftalen.

Între drojdii şi bacterii alegerea se face cu dificultate, datorită avantajelor dar şi dezavantajelor pe care le prezintă ambele grupe de microorganisme în valorificarea hidrocarburilor. Şi în cazul utilizării hidrocarburilor ca mediu de cultură avantajele folosirii drojdiilor se datoresc posibilităţii de recoltare—separare prin centrifugare (celula de drojdie are diametrul de 5 μm, iar cea de bacterie 1 μm), comestibilităţii şi lipsei de toxicitate, verificate în decursul a mai multor ani prin introducerea drojdiei furajere în alimentaţia puilor, purceilor şi viţeilor, conţinutul ridicat de proteine şi aminoacizi esen-

ţiali şi scăzut de acizi nucleici. Celula bacteriană are un conţinut superior de acizi nucleici, motiv pentru care proteina bacteriană nu este preferată în hrana animalelor şi/sau alimentaţia oamenilor.

În acelaşi timp, în alegerea microorganismului trebuie să se ia în consideraţie ca acesta să fie capabil pentru a utiliza sursa de hidrocarburi disponibilă ; să nu se manifeste exigenţe vitaminice mari care să ducă la creşterea preţului de cost al proteinei ; microorganismul, drojdie sau bacterie, să nu fie fragil din punct de vedere mecanic şi să ofere posibilităţi simple de recoltare şi separare a hidrocarburilor neutralizate.

Drojdiile se carcterizează şi printr-un randament ridicat. Champagnat (1963) şi Roussy (1969) au folosit o tulpină de *Candida lipolytica* pe care au cultivat-o pe *n*-parafină, constatînd că prin utilizarea a 10 t petrol brut s-a obţinut 1 t masă celulară şi 9 t de petrol deparafinat. Cercetătorii de la British Petroleum Ltd au studiat problema îndepărtării parafinei din fracţiunile de petrol prin convertirea ei în masă celulară. Deparafinarea realizată prin intermediul drojdiilor este mai puţin costisitoare, obţinîndu-se în acelaşi timp proteine furajere sau alimentare şi alte substanţe biologic active (vitamine ş.a.).

Rezultate similare au raportat Miller şi Johnston, care au folosit *Candida* sp. pentru îndepărtarea alkanilor cu 15—30 atomi de carbon. Randamentul înregistrat a variat între 73 şi 96%. Se apreciază că la 1 000 milioane tone petrol brut 700 milioane tone sînt parafine iar prin folosirea a 1% din acest petrol se pot obţine 7 milioane tone concentrate proteine-vitamine. Producţia de proteine se realizează în acelaşi timp cu un randament mult superior producţiei naturale. Wiley (1962) a calculat că un bou de 500 kg produce în 24 ore 500 g proteine, în timp ce 500 kg drojdii cultivate pe parafine produc în acelaşi timp 1 250 kg proteine. Se consideră că fiecare tonă de hidrocarburi poate produce aproximativ o tonă concentrate proteice-vitamine, cu un conţinut de 40—50%.

Analizele chimice au evidenţiat că proteina este foarte bogată în lizină şi săracă în metionină şi cistină. Se remarcă de asemenea prezenţa în cantitate mare a vitaminelor din grupa B (B_1, B_2, B_6, B_{12}, PP, acidul pantotenic).

Se consideră că folosirea a 15—20% din producţia mondială de petrol poate asigura producerea întregii cantităţi de proteine necesară locuitorilor globului. Se apreciază că în prezent deficitul de proteine la scară globală este de 3—9 milioane tone. Preţul relativ ridicat al proteinei obţinută din parafină şi oscilaţiile preţului petrolului au încetinit ritmul de implementare de noi instalaţii. Este cazul fabricii de la Curtea de Argeş care studiază alternativa utilizării alcoolului metilic, cel puţin în perioada de crize. În acelaşi timp constatarea unor efecte secundare la animalele hrănite cu proteinele obţinute pe parafine a determinat unele firme să-şi închidă instalaţiile sau în cel mai bun caz să nu se extindă şi/sau să limiteze producţia.

Pentru obţinerea drojdiei alimentare şi în mai mică măsură pentru a celei furajere se folosesc borhotul rezultat de la fabricarea prin fermentaţie a alcoolului, melasa de sfeclă şi trestie de zahăr. Melasa de sfeclă conţine 48—50% zaharoză, 1% rafinoză, 1% glucoză şi fructoză, iar melasa de trestie de zahăr conţine peste 62% zahăr total din care 30—40% zaharoză, restul fiind reprezentat de glucoză şi fructoză. În plus, melasele conţin o serie de vitamine ca biotina, tiamina, acidul pantotenic, aminoacizi, elemente minerale (Topală, 1986). Conţinutul ridicat de zahăr în melasă determină un randament mare. De exemplu, prin cultivarea speciilor *Candida tropicalis*, *C. pelliculos*, *C. utilis* s-au obţinut 30 g biomasă proteică uscată cu un conţinut proteic de circa 50% pentru 100 g zahăr consumat.

În mod frecvent se folosesc specii ale genului *Candida* (*C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*) şi *Hansenula anomala*.

În prezent melasele se utilizează numai în ţările cu climat tropical şi subtropical, care dispun de mari cantităţi de melasă de trestie. În Egipt din 60 000 t melasă de trestie se obţin anual circa 20 000 t drojdie furajeră, ceea ce echivalează cu 10 000 t proteine (El Nawawy, 1978). În celelalte ţări, inclusiv la noi, melasa se foloseşte pentru obţinerea drojdiei de panificaţie şi numai pentru îmbogăţirea conţinutului în zahăr, aminoacizi, vitamine, a leşiilor bisulfitice sau hidrolizatelor celulozice.

Borhotul de la fabricarea alcoolului etilic prin fermentaţie alcoolică reprezintă o sursă de materii prime pentru cultivarea drojdiilor. În afara faptului că el conţine celule de *S. cerevisiae* care au participat la fermentaţie (3—9 kg — 8—16 kg/hl) şi care pot fi separate şi folosite, prin prezenţa glucidelor, acizilor organici, compuşilor azotaţi şi sărurilor minerale, constituie un valoros mediu de cultură pentru *Candida utilis* sau alte specii care pot da 10—14 kg biomasă/hl mediu.

În ultimii ani s-au intensificat cercetările pentru folosirea metanolului şi etanolului. Concentraţiile relativ scăzute care se folosesc şi preţul acceptabil au făcut din metanol un posibil substrat pentru obţinerea proteinelor furajere. Între avantajele pe care le prezintă metanolul în comparaţie cu *n*-parafinele, melasa, leşiile bisulfitice, hidrolizatele de celuloză amintim :

— preţ de cost relativ scăzut şi posibilitatea de a se obţine în cantităţi suficiente din gaz natural, gaze de sondă, petrol, cărbune inferior ;

— compoziţie constantă şi puritate ridicată ;

— este miscibil cu apa iar metabolizarea lui necesită un conţinut redus de O_2 ;

— nu lasă reziduuri în celule (Topală, 1986).

Pe metanol pot creşte numeroase specii din genurile *Candida Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Debaryomyces*, *Zygomyces*, *Criptococcus*, *Bretanomyces*, *Rhodotorula*. ş.a.

Randamentul în biomasă/g metanol variază în limite foarte mari — 0,29—0,67 g biomasă uscată/g metanol consumat şi este dependent de specie şi tehnologie. Litchfield (1972) a raportat un randament de 0,95 g substanţă uscată/g metanol consumat prin cultivarea speciei *Hansenula polimorpha* pe un mediu ce conţine 5 ml metanol/l.

Şi conţinutul în proteină este dependent de specia şi tehnologia utilizate. De exemplu, Podgorsky (1982) a raportat că biomasa de *Candida boidinii*, obţinută în US conţinea 59—60 % proteină brută (N ×6,25) iar Tpoală şi colab. (1979) au înregistrat un conţinut proteic brut de 61,25—63,84%. Un conţinut similar au găsit Cardini şi colab. (1976) la *C. boidinii* (61—64 %). Proteinele obţinute pe metanol se remarcă prin prezenţa aminoacizilor esenţiali, a vitaminelor din grupa B, care conferă o valoare biologică ridicată a digestibilităţii de 85—90 %.

Un avantaj mai mare, în special pentru obţinerea drojdiei alimentare folosită în panificaţie şi hrana oamenilor, îl reprezintă etanolul ; datorită a numeroase avantaje, în comparaţie cu celelalte medii de cultură :

— este folosit în mod frecvent ca aliment şi în compoziţia a numeroase băuturi alcoolice ;

— este un substrat foarte pur şi este miscibil cu apa ;

— metabolizarea lui necesită cantităţi mici de oxigen ;

— poate fi obţinută şi din resurse regenerabile (Humphrey 1981).

Prețul relativ ridicat, în comparație cu alte substraturi, se datorește gradului ridicat al volatinizării în soluții diluate și utilizarea cu ușurință de diverse microorganisme care pot deveni contaminante. Acesta poate fi compensat de puritatea și valoarea nutritivă a proteinei obținută. O concentrație de maximum 2 g/l a condus la un randament de 0,75 g biomasă uscată/g etanol consumat (sau 40—60 g celule/l mediu); rezultatele încurajatoare au stimulat cercetările și investițiile. Încă din 1974, Amaco Foods Co (S.U.A.) obținea 5 000 — 7 000 t proteină alimentară/an prin ciltivarea speciei *C. utilis* pe etanol. În Japonia, Mitsubishi Petrochemical Co. a produs în 1976 100 t biomasă proteică, folosind *C ethanothermophilum*. În Cehoslovacia firma Slovnaft a produs, în 1974, 1 000 t proteină. Investiții mai mari s-au făcut în Spania. Institutul Fermentaciones Indistriales a elaborat o tehnologie de obținere a proteinelor pe etanol cu *Hansenula anomala* iar firma Cepsa a proiectat o uzină cu capacitatea de 100 000 t/an. Deși proteinele obținute pe etanol sînt cele mai scumpe, sînt singurele care pot fi folosite în prezent în alimentația omului (Topală, 1986).

Lactozerul de la fabricarea brînzeturilor reprezintă o importantă sursă de materii prime pentru obținerea proteinelor de biosinteză. În mod frecvent sînt cultivate *Kluyveromyces lactis* și *K. fragilis*. Lactoza din zer constituie substratul de conversie, utilizîndu-se un zer deproteinizat prin precipitare sau filtrare. Zerul este suplimentat cu azot mineral și oligoelemente și ajustat la un *p*H cuprins între 5 și 5,7. Randamentul în biomasă este de circa 53% din masa lactozei utilizată ca mediu de cultură. În procesul bioconversiei lactozei în biomasă proteică se poate obține simultan și alcool etilic. Cantitatea de alcool produsă poate crește dacă, după o perioadă inițială de bioconversie în condiții anaerobe, mediul este îmbogățit cu lactoză. În aceste condiții 90% din lactoză este transformată în alcool. Biomasa proteică obținută are următoarea compoziție (g/100 g): proteină (N × 6,25) 50%, glucide 30,3%, lipide 6%, elemente minerale 8,1%, colină 0,5%, glutation 0,5%, vitamine din grupa B 0,07%, vitamina C 0,06%. Valoarea nutritivă a biomasei proteice este dată și de conținutul ridicat în aminoacizi esențiali (treonină 2,2%, cisteină + cistină 0,5%, valină 2,2%, metionină 0,8%, tirozină 1,5%, izoleucină 2,0%, leucină 3,3%, fenilalanină 1,5%, lizină 3,5%, triptofan 0,6%), comparabilă cu proteina animală. Biomasa este bogată și în vitamine (tabelul 5).

Tabelul 5

Conținutul în proteine și vitamine al drojdiei alimentare
(Pyke, 1958)

Specia	Substratul	Proteină, %	Tiamină*	Riboflavină*	Acidul nicotinic*	Acidul pantotenic*
Drojdia de panificație	Melasă	50	20—40	60—85	200—700	180—370
Drojdia de bere	Bere	37	100—250	25—80	300—637	72—86
Candida arborea	Melasă	39—49	13—33	46—70	310—500	—
Hansenula sp.	Zahăr-lemn	53	8	54	590	—
Mycotorula sp.	Zahăr-lemn	51	5	59	600	180
Oidium lactis	Melasă	31—43	12—29	40—55	190—250	—
Torulopsis utilis	Leșie sulfitică	50—53	5	43	420	39
Torulopsis utilis	Melasă	40—61	22—38	54—62	440—600	—

* Vitaminele: μg/g substanță uscată.

Glucidele sînt formate în general din glicogen (5%), galactomanan (6%), glucogalactan (14%), glucomanan (5%). Lipidele au un conținut ridicat în acizi grași nesaturați (oleic 985 mg/100 g), linolenic 250 mg/100 g, linoleic 705 mg/100 g).

În S.U.A. a fost elaborat un procedeu (Nitrisearch) de obținere a biomasei prin cultivarea pe zer a drojdiei de panificație (*S. cerevisiae*) (C. Banu, 1978).

Drojdia alimentară și furajeră prezintă calități și caracteristici variate în funcție de specia și substratul folosit (tabelele 6 și 7). În general conține 40—50% proteină, 25—35% glucide, 6—8% substanțe minerale, 2—3% grăsimi, vitamine. Drojdia furajeră produsă în țara noastră se prezintă sub forma unui praf gălbui-brun, cu gust și miros caracteristic, cu umiditate de 7—8%. Conținutul proteic variază între 37 și 57% (37—50% Reconstrucția Piatra Neamț, 44% Zărnești—Brașov, 45—48% Letea—Bacău, 45—56% Arad, 54—56% Turnu Severin, 55—56% Blaj—Alba, Comănești—Bacău, 55—57% Pitești, 56—57% Suceava).

Tabelul 6

Producția și conținutul în proteină a drojdiei dezvoltate pe diferite medii de cultură
(Prescott și Dunn, 1959)

Specia	Mediul de cultură	Producția de drojdie uscată, %	Conținutul în proteine, %
Candida arborea	Melasă (sfeclă și trstie)	55—64*	38,8—49,4
Hansenula anomala	Hidrolizat de lemn	39—40+	—
Hansenula suaveolens y-838	Zahăr din lemn de distilat	53—63**	53,4
Mycolorula lipolytica P-13	Hidrolizat de lemn	35—40*	—
Mycolorula lipolytica P-13	Zahăr din lemn de distilat	53—63**	51,0
Oidium lactis	Melasă (sfeclă și trestie)	55,8—60,0*	31,2—41,9
Saccharomyces cerevisiae	Melasă (sfeclă și trestie)	42,7—54,3*	42,5—53,1
Torulopsis utilis — 3	Hidrolizat de lemn	35—40+	—
T. utilis — 3	Hidrolizat de lemn	30,5—52,6*	51,9—58,6
T. utilis — 3	Leșie sulfitică	29,6—39,2*	51,0—52,7
T. utilis — 3	Reziduuri de fermentație	47,0—52,0*	50,0
T. utilis — 3	Zahăr din lemn de distilat	53—63**	52,9
T. utilis (Anhenser-Busch)	Melasă (trestie de zahăr)	45,1—48,48	33,1—50,8
T. utilis	Melasă (sfeclă de zahăr)	53,5—65,3*	43,7—60,6
T. utilis	Melasă	56,0*	50,0
T. utilis	Suc de fructe	53,0*	50,0
T. utilis major	Suc de fructe	59,0—62,0**	56,0

+ pe baza zaharurilor reducătoare totale
* pe baza zahărului total
** pe baza zahărului consumat
pe baza zahărului din melasă

Tabelul 7

Conținutul în aminoacizi al drojdiilor cultivate pe diferite medii (în g/100 g proteine) (Oniscu, 1978)

Aminoacizi	*S. cerevisiae* (cultivată pe melasă)	*C. utilis* (cultivată pe leșii bisulfitice)	*S. fragilis* (cultivată pe zer)	Drojdie de bere (dezapomotizată)	Drojdie de panificație	*C. utilis* (cultivată pe melasă)
Arginină	5,0	5,4	4,9	4,7	4,3	4,7
Cistină	1,6	0,7	—	0,9	1,2	0,3
Fenilalanină	4,5	4,3	3,9	4,4	5,6	4,1
Histidină	4,0	1,9	2,5	1,5	3,6	2,8
Izoleucină	5,5	5,3	5,5	5,7	7,3	7,3
Leucină	7,9	7,6	9,9	6,3	7,7	8,1
Lizină	8,2	6,7	8,8	7,3	9,7	10,7
Metionină	2,5	1,2	1,5	1,2	3,5	1,4
Treonină	4,8	5,5	5,5	4,8	7,0	4,8
Triptofan	1,2	1,2	1,5	1,1	1,7	0,5
Valină	9,5	6,3	6,6	5,2	5,9	5,2

Folosirea proteinelor de biosinteză în suplimentarea hranei animalelor și introducerea lor în alimentația omului depinde de valoarea nutritivă, toxicitate, digestibilitate etc.

Valoarea nutritivă este dată de conținutul în proteină totală și în mod deosebit în aminoacizi esențiali, vitamine, săruri minerale. Dintre aminoacizii esențiali care conferă valoarea nutritivă superioară, lizina se găsește în cantitatea cea mai mare. Pentru a mări valoarea nutritivă a drojdiei furajere se recomandă adăugarea de metionină obținută industrial. S-a constatat că prin suplimentarea cu 0,3% metionină, valoarea nutritivă a drojdiei a crescut de la 61 la 91. La aminoacizii esențiali se adaugă conținutul ridicat de vitamine (B_1, B_2, B_6, acizii nicotinic, pantotenic, folic, paraminobenzoic, biotina, inozina). Vitaminele din grupul B conferă o calitate superioară nutrețurilor folosite pentru hrana animalelor, fiind strîns legate de schimburile metabolice din organismul animal. Drojdia furajeră reprezintă, de asemenea, o sursă bogată în vitamina D_2. În compoziția drojdiei se găsește ergosterol care prin iradiere cu UV se transformă în vitamina D_2. Într-un kilogram de drojdie furajeră cantitatea de vitamine poate ajunge la 5 000 — 12 000 UV. (tabelul 8).

Tabelul 8

Conținutul în vitamine din grupa B a unor drojdii alimentare (în mg/100 g substanță uscată) (Oniscu, 1978)

Vitamine	*Candida arborea* (cultivată pe borhot de melasă)	*Candida tropicalis* (cultivată pe borhot de melasă)	*Candida utilis*	
			cultivată pe borhot	cultivată pe borhot +33% melasă
Tiamină	2,32—2,96	3,77—9,43	2,75—7,79	1,76—3,65
Riboflavină	5,10—9,64	4,67—6,45	2,89—7,10	6,86—13,0
Niacină	53,51—59,1	46,6—51,13	45,57—60,88	67,23—84,15

Conținutul ridicat în enzime asigură îmbunătățirea metabolismului organismului animal și creșterea gradului de asimilare a proteinelor și hidraților de carbon. Prin introducerea drojdiei furajere în alimentație se reduce consumul specific de nutrețuri. Vitaminele din grupa B, componente ale sistemelor enzimatice, contribuie la asimilarea aminoacizilor și sinteza proteinelor. Prezența elementelor minerale P, K, Ca, Fe, Mg, Na, S, Cu, Mn, Co ș.a. conferă drojdiei o valoare nutritivă superioară. S-a stabilit că 1 kg de drojdie furajeră conține pînă la 1,07 — 1,16 unități nutritive și pînă la 380—480 g proteină digerabilă.

Într-o serie de țări producătoare de drojdie furajeră și alimentară (Anglia, Cehoslovacia, Germania, Franța, România, S.U.A., C.S.I. ș.a.) s-a testat valoarea nutritivă a drojdiei furajere, pe o gamă largă de animale de crescătorie (păsări, purcei, viței, animale de blană).

De exemplu, un adaos de 8—10% drojdie furajeră aduce un spor în greutatea animalului de 15—20% și reduce consumul de nutrețuri cu cel puțin 10%. Drojdiile pot înlocui 20—30% din cantitatea de lapte folosită la hrana vițeilor, asigurînd în același timp un spor zilnic în greutate de 650—750 g. În mod concret s-a constatat că 1 kg de drojdie furajeră poate înlocui 4—6 kg lapte. La animalele de lapte introducerea drojdiei furajere în nutrețuri mărește cantitatea de lapte muls și procentul de grăsimi. Cantitatea de lapte muls a crescut cu 3—3,5 l în 24 ore, iar cantitatea de grăsimi cu 0,4—0,6%. O influență favorabilă o are adaosul de drojdie în hrana păsărilor ouătoare. Un adaos de 5% drojdie furajeră din cantitatea totală de nutrețuri în rația păsărilor mărește cu 20—40% producția de ouă.

Drojdia furajeră contribuie, de asemenea, la îmbunătățirea gustului cărnii, mărește vitalitatea animalelor și scade mortalitatea, în special a puilor, vițeilor și purceilor.

Cu rezultate bune se folosește drojdia furajeră în crescătoriile de pește și apicultură pentru suplimentarea hranei albinelor primăvara timpuriu.

Drojdia furajeră folosită în hrana animalelor sălbatice crescute pentru blană a dus la mărirea rezistenței animalelor la îmbolnăviri și la o îmbunătățire a calității blănii.

În privința toxicității s-a constatat că, indiferent de natura mediului de cultură, proteinele de biosinteză se încadrează în standardele Uniunii Internaționale de Chimie Pură și Aplicată (I.U.P.A.C.), conținutul în compuși aromatici ai drojdiilor cultivate pe *n*-alcani fiind inferior cifrei de 5 ppd (părți per bilion) stabilită de I.U.P.A.C. În același timp se recomandă ca în produsul finit să nu fie prezente microorganismele patogene sau care dau efecte secundare. I.U.P.A.C. a stabilit standardele microbiologice obligatorii pentru proteinele de biosinteză folosite în hrana animalelor. În privința conținutului în acizi nucleici (5—10%) se întreprind cercetări pentru obținerea unor tulpini care să producă o cantitate redusă de acizi nucleici. Pentru reducerea conținutului de acizi nucleici, se practică tratarea drojdiei furajere, după îndepărtarea pereților celulari, cu un amestec de NaCl și acetat de sodiu sau metanol (etanol) și HCl, soluție apoasă de amoniac, tratament termic etc. (tabelul 10).

Aspectul gălbui-brun și mirosul caracteristic face ca în prezent drojdia furajeră să fie folosită numai în hrana animalelor. Pentru introducerea în alimentația omului și înlocuirea sau completarea resurselor animale de proteine trebuie satisfăcute unele condiții și îmbunătățite o serie de caracteristici ca mirosul, aroma, culoarea, digestibilitatea constituenților pereților celulari.

Tabelul 9

Variația conținutului în acizi nucleici al tulpinilor analizate

Tulpina analizată	Cantitatea de acizi nucleici g %		Raport ARN/ADN
	ADN	ARN	
Saccharomyces carlbergensis	0,26	5,33	20,5
Saccharomyces diastaticus	0,142	5,61	39,5
Saccharomyces elipsoideus	0,299	8	26,75
Saccharomyces pombe	0,150	3,33	22,2
Candida boidinii	0,1420	6,66	46,9
Candida robusta	0,207	6	28,98
Hansenula anomala	0,1355	4,33	31,95

Peretele celular intact și nedigerabil împiedică accesul enzimelor digestive la conținutul celulei.

Folosirea unor condimente și substanțe aromatice va asigura obținerea unui preparat proteic care să concureze „carnea sintetică" din soia, aflată deja în comerț. Prin conținutul său în aminoacizi și vitamine, drojdiile alimentare reprezintă un aport important în substanțe nutritive. Testarea pe copii, bolnavi și animale de laborator în diverse clinici medicale din Franța, Germania, România a evidențiat o ameliorare a stării generale, creșterea în greutate și vigorii. C.N.E.R.A. (Franța) a recomandat, încă din 1953, administrarea la copii din colectivități a unei doze zilnice de drojdie uscată, iar Organizația Mondială a Sănătății a recomandat folosirea drojdiilor ca sursă de vitamine.

Cercetările efectuate în ultimii ani au condus la introducerea unor date ce conțin produse obținute din drojdie (supe, biscuiți, prăjituri ș.a.) în vederea ameliorării și chiar a vindecării unor afecțiuni digestive, hepatice, nervoase, inflamatoare etc. S-a constatat că o dietă de pînă la 35 g/zi a condus la ameliorarea semnificativă a bolnavilor care sufereau de arteroscleroză, diabet, obezitate. Conținutul ridicat în proteine și vitamine exercită un efect protector asupra ficatului, contribuind la prevenirea degenerării celulei hepatice și la revitalizarea funcțiilor acesteia. Pornind de la observația că aminoacizii cu sulf din proteine de drojdie au capacitatea de a se uni cu diverse metale s-au obținut diverse combinații — selenometionină, selenoglutation, selenocistină, selenocisteină, recomandate în bolile cardiovasculare și cancer. Virtuți deosebite au fost descoperite la glutation. Glutationul participă la eliminarea substanțelor toxice, inlusiv a cancerigenilor prin intermediul glutationtransferazei și influențează favorabil sistemul imunitar, mărește rezistența organismului față de cancerigeni și radiații. Glutationperoxidaza asigură protecție celulei față de diverse substanțe toxice (nitriți, nitrozamine, peroxizi, metale grele, medicamente ș.a.).

Vitaminele din grupa B exercită un efort protector în intoxicațiile cu hidrocarburi clorurate, benzol, fenol, mercur, plumb, sulfură de carbon, fluor ș.a. Vitamina B_1, de exemplu, este recomandată în peste 230 de afecțiuni, între care se numără diabetul, hipertensiunea, arteroscleroza, cancerul. Vitamina B_2 se recomandă în numeroase maladii (dermatite, conjunctivite, psoriazis, cheratite) și inhibă dezvoltarea cancerului de ficat indus de colo-

ranţii azotici. Influenţe favorabile asupra sănătăţii organismului o au şi celelalte vitamine din grupul B (Segal, 1991).

Deşi, în ultimii ani, industria de producere a proteinelor de biosinteză se confruntă cu numeroase probleme, printre care aprovizionarea ritmică cu mediul de cultură, în cantitate suficientă şi de calitate superioară, preţ de cost ridicat al acestuia, dezvoltarea acestei industrii este de mare actualitate datorită posibilităţii de a satisface deficitul de proteine şi vitamine în tot timpul anului, producţia nefiind influenţată de condiţiile atmosferice.

1.2. SPECIILE FOLOSITE ÎN INDUSTRIA DE PROTEINE

Drojdiile de sinteză proteică sînt în general drojdii imperfecte care în marea majoritate nu prezintă sexualitate, motiv pentru care investigaţiile genetice se bazează numai pe analiza ciclului parasexuat.

Pentru producerea proteinei furajere şi/sau alimentare sînt preferate drojdiile deoarece pot fi mai uşor separate de mediul de cultură datorită dimensiunii mai mari a celulei (5 µm) şi conţinutului scăzut în acizi nucleici (5—10%). În acelaşi timp pH-ul scăzut la care se dezvoltă reduce pericolul de contaminare.

Depăşirea acestei valori atrage supă sine obţinerea unor tulpini cu un conţinut scăzut de acizi nucleici sau utilizarea drojdiilor furajere numai pentru suplimentarea produselor alimentare sau furajelor şi numai într-o proporţie de maximum 10%.

Incriminarea componentelor peretelui celular bacterian ca fiind cancerigene constituie un argument în plus pentru utilizarea drojdiilor în industria de proteine şi înlocuirea bacteriilor sau limitarea folosirii acestora nu numai în industrua de biosinteză dar şi în experienţele de inginerie genetică care vizează producerea unor hormoni (insulina), medicamente şi alte substanţe biologic active.

În industrua de biosinteză se utilizează un mare număr de specii ce aparţin genurilor: *Candida, Crypococcus, Debaryomyces, Endomycopsis, Hansenula, Kloeckera, Kluyveromyces, Leucosporidum, Lodderomyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Schwdnniomyces, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Torulopsis, Trichosporon, Wingea* ş.a. (tabelul 9).

Tabelul 10

Specii de drojdii utilizate în industria de proteine

Specia	Mediul de cultură
Candida albicans	n-alcani
C. arborea	n-alcani melasa, leşii bisulfitice şi hidrolizate de celuloză
C. boidinii	Metanol
C. cariosilignicela	Metanol
C. cloaceae	n-Alcani
C. dulcherina	n-Alcani
C. guilliermondii	n-Alcani
C. intermedia	n-Alcani

Tabelul 10 (continuare)

Specia	Mediul de cultură
C. lipolytica	*n*-Alcani
C. maltosa	*n*-Alcani
C. methanophilum	Metanol
C. metanolica	Metanol
C. parapsilopsis	*n*-Alcani
C. pelliculosa	*n*-Alcani
C. robusta	Leşii bisulfitice şi hidrolizate de celuloză
C. rugosa	*n*-Alcani
C. silvicola	Metanol
C. succiphila	Metanol
C. tropicalis	Leşii bisulfitice, hidrolizate de celuloză şi *n*-alcani
C. utilis	Leşii bisulfitice, hidrolizate de celuloză, amidon melasă
C. zeylanoides	*n*-Alcani
Cryptococcus sp.	Metanol
Debaryomyces sp.	Etanol, *n*-alcani
Endomycopsis fibuligera	Amidon
Hansenula anomala	*n*-Alcani, etanol
H. capsulata	Metanol
H. glucozyma	Metanol
H. henricii	Metanol
H. minuta	Meatnol
H. nonfermentans	Metanol
H. philodendra	Metanol
H. polymorpha	Metanol
H. wickerhamii	Metanol
Kloeckera sp.	Metanol
Kluyveromyces fragilis	Lactozer
K. lactis	Lactozer
Leucosporidium sp.	*n*-Alcani
Lodderomyces sp.	*n*-Alcani
Metschnikowia sp.	*n*-Alcani
Pichia cellobiosa	Metanol
P. haplophila	*n*-Alcani
P. methanolotherma	Metanol
P. lindnerii	Metanol
P. pastoris	Metanol
P. pinus	Metanol
P. trehalophila	Metanol
Rhodotorula sp.	Etanol şi *n*-alcani
Rhodosporidium sp.	*n*-Alcani
Saccharomyces cerevisiae	Etanol, melase
Saccharomycopsis lipolytica	*n*-Alcani
Schwanniomyces sp.	*n*-Alcani
Sporidiobolus	*n*-Alcani
Torulopsis famata	Metanol
T. glabrata	Metanol
T. gropengresseri	*n*-Alcani
T. methanosorboza	Metanol
T. methanolovescens	Metanol
T. molischiana	Metanol
T. nemodendra	Metanol
T. nitratophila	Metanol
T. pinus	Metanol
T. sonorensis	Metanol
Trichosporan sp.	*n*-Alcani
Wingea sp.	*n*-Alcani

Din numărul mare de specii care se întrebuințează în industria de biosinteză sau cu potențialități de a fi utilizate în producție, sau în programele de ameliorare a drojdiilor industriale, vom descrie pe cele mai reprezentative.

A. DROJDII SPOROGENE

1.2.1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE HANSEN

S. cerevisiae este tipul reprezentativ al genului *Saccharomyces* Meyenemend Reess. Numele generic de *Saccharomyces* a fost introdus de Meyen în 1838, iar genul a fost definit pentru prima dată în 1870 de Reess.

Drojdiile din genul *Saccharomyces* prezintă celule de formă variată: rotunde, ovale, alungite, cilindrice, care uneori formează pseudomicelii. Se înmulțesc pe cale vegetativă prin înmugurire multilaterală și sexuat prin spori. În condiții naturale, celula diploidă se transformă în urma diviziunii meiotice într-o ască cu patru ascospori — 2α și 2_S. Lindegren și Lindengren au demonstrat existența unei perechi de alele *a* și α, care controlează împerecherea. Pe mediu nutritiv complet sau în condiții optime de hrană în natură, între spori sau celule vegetative sa realizează conjugarea, rezultînd zigotul diploid. Locusul tipului de împerechere la *S. cerevisiae*, de exemplu, denumit *MAT*, este localizat în cromozomul III și există sub forma a două alele *MATa* și *MAP*α, care controlează diferențierea sexuată, producerea de feromoni, aglutinarea, împerecherea și sporularea (fig. 1 și 2)

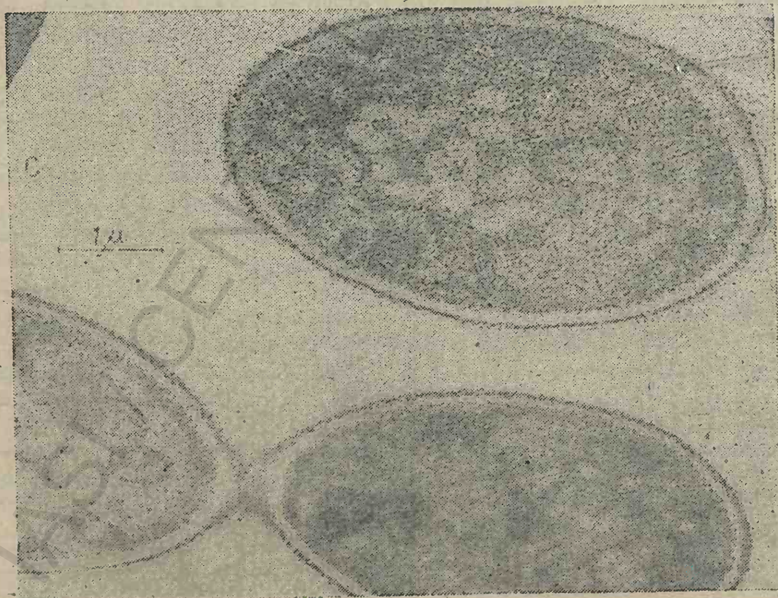


Fig. 1. Ultrastructura celulei de *Saccharomyces cerevisiae*, înmugurirea și procesul de diferențiere a peretelui despărțitor.



Fig. 2. Ultrastructura unei asce cu patru spori haplozi de la *Saccharomyces cerevisiae.*

Toate tulpinile de drojdii aparțin la două tipuri : heterotalic și homotalic. În practică homotalismul și heterotalismul la drojdii se determină prin testarea capacității de sporulare și împerechere. Heterotalismul presupune obligatoriu încrucișarea între celule de tip opus de împerechere *a* și α care derivă din culturi unisporale. Zigoții diploizi rezultați segregă totdeauna în raport de $2a : 2\alpha$. Homotalismul a fost observat la *S. cerevisiae vkr ellipsoideus* și ulterior la *F. chevalieri.*

Studiul genetic al diverselor tulpini a evidențiat că o singură pereche de alele denumită *Ho/ho* este responsabilă pentru diferențierea homotalism/heterotalism. Studiul segregării la teraploizi a arătat că homotalismul este dominant. Diferența de comportare a celor două tipuri de tulpini se datorește prezenței genei *Ho* în tulpinile homotalice, în tulpinile heterotalice fiind prezentă alela *ho* (Biologia și tehnologia drojdiilor I. Anhgel și colab., 1989, Ed. Tehnică).

S. cerevisiae este specia folosită din cele mai vechi timpuri în industria de bere și panificație și cea mai mare parte a drojdiei alimentare și furajere este obținută prin recuperarea acestei drojdii de la fabricile de bere. Dezavantajele folosirii tulpinilor de *S. cerevisiae* pentru producerea industrială de drojdie alimentară și furajeră îl constituie tendința de a se dezvolta pe substraturi mai costisitoare.

S. cerevisiae izolată din bere și ulterior din vin, după cultivarea pe extract de malț timp de 3 zile, se prezintă sub forma unor celule sferice,elipsoidale, cilindrice, alungite, dispuse izolat sau în perechi și ocazional formează lanțuri și aglomerări. Celulele de *F. cerevisiae* se încadrează în 3 grupe de dimensiuni : în prima grupă sînt încadrate celulele cu dimensiunile $4{,}5-10{,}5 \times \times 7-21$ µm, cele din grupa a doua au dimensiuni de $2{,}5-7 \times 4{,}5-11-18{,}5$ µm, iar ultima grupă, a III-a, cuprinde celule cu cele mai mici dimensiuni, $3{,}5-8 \times 5(11{,}5)-17{,}5$ µm.

Se întîlnesc şi celule filamentoase care ajung la 30 μm lungime. În mediu lichid formează sediment şi ocazional un inel incomplet. Prin conjugarea a doi spori de tip de împerechere diferit se formează zigotul diploid α/a, care în urma meiozei se poate transforma într-o ască cu unul pînă la patru ascospori. Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza, maltoza, 1/3 din rafinoză şi dextrinele. Asimilează alcoolul etilic, glicerina şi acidul lactic. *F. cerevisiae* suportă bine aciditatea şi alcoolul şi se dezvoltă optim între 25 şi 30°C. Datorită capacităţii de a produce alcool (pînă la 14%) prezintă interes pentru industria fermentativă (Lodder, 1970). În laborator poate fi crescută la 30°C, pe mediu complet [extract de drojdie 1%, peptonă 2%, glucoză 2%, sau K_2HPO_4 0,2%, $MgSO_4$ 0,1%, $(NH)_2SO_4$ 0,1% autolizat de drojdie 1%].

1.2.2. SACCHAROMYCOPSIS LIPOLYTICA (WIRCKERHAM) YARROW

Este o specie heterotalică ce prezintă două tipuri de împerechere *A* şi *B*. Din fuziunea celulelor vegetative sau sporilor *A* şi *B* rezultă diploizi ce se reproduc vegetativ. În comparaţie cu *S. cerevisiae* celulele haploide de *S. lipolytica*, de tip împerechere opus, fuzionează rar iar majoritatea zigoţilor rezultaţi avortează. Prin sporularea diploizilor se formează asce ce conţin 1—4 ascospori, care prezintă o capacitate scăzută de germinare (> 1%). Aceste trăsături negative pot fi remediate prin încrucişări repetate frate × soră pînă cînd 80—90% dintre asce conţin patru ascospori, cu o capacitate de germinare de 90% (Heslot, 1981).

Celulele au forme şi dimensiuni diferite, de la oval pînă la cilindrice, şi dimensiuni cuprinse între 4,4—6,1 × 14—21 μm. Se înmulţesc şi prin înmugurire formînd lanţuri sau pseudomicelii. În prezenţa unei concentraţii optime de CO_2 (15% *w/v*) cresc la temperatura de 30...40°C. Fermentează glucoza, zaharoza şi rafinoza. Pentru creştere sînt necesare următoarele vitamine: acidul nicotic, pantotenic, tiamina şi inositolul. Pot fi crescute şi conservate pe mediu lichid ce conţine autolizat de drojdie sau extract de drojdii 1% *w/v* peptonă şi glucoză 2%. Pereţii celulei de *Saccharomycopsis* sînt mult mai rezistenţi decît cei de la *Saccharomyces* şi conţin 16—17% proteine, 72% hidraţi de carbon, 16—19% chitină şi 0,04—0,06% fosfaţi. Raportul glucan/manan este de 2 : 1, în timp ce la *S. cerevisiae* este de 1 : 1 (Phaff, 1990). În actualele sisteme de clasificare *Saccharomycopsis lipolytica* este sinonimă cu *Candida lopolytica* (*Saccharomycopsis Candida lipolytica*). Cu toate acestea la grupul de drojdii asporogene (imperfecte) am menţinut şi descris şi specia *Candida lipolytica*, fără ca datele să se suprapună cu cele prezentate la *Saccharomycopsis lipolytica*. Studiile ulterioare vor definitiva mai precis locul pe care îl ocupă această specie.

1.2.3. DEBARYOMYCES LODDER KREGER-VANRIJ

Se reproduce prin înmugurire multipolară. Forma celulelor este variată. Ocazional formează pseudomicelii. Conjugarea heterogametică între celula-mamă şi mugure precede formarea ascei. Poate avea loc şi conjugarea isogamă. Sporii sînt sferici sau ovali. În general se formează 1—2 spori/ască, dar la unele specii se diferenţiază asce cu 4 ascospori. Speciile de *Debaryomyces* sînt lipsite de capacitate fermentativă sau aceasta este slabă.

Genul *Debaryomyces* cuprinde 8 specii (*D. cantarelli, D. castellii, D. coudertii, D. hansenii, D. marama, D. phaffii, D. tamarii, D. vanrijii*).

Speciile genului *Debaraomyces* au fost subîmpărțite în două grupe.

Prima grupă conține speciile: *D. coudertii, D. hansenii, D. marama* și *D. tamarii* care au o capacitate de fermentație viguroasă. Celulele sînt mici, sferice sau ușor ovale și necesită vitamine pentru creștere. Utilizează manitolul și glucitolul.

Grupa a doua cuprinde speciile de celule sferice, oval-alungite și care pot forma un pseudomiceliu primitiv. Cele mai multe specii formează o peliculă pe extract de malț. Speciile *D. cantarellii, D. castellii, D. phaffii* fermentează glucidele, iar *D. vanrijii* nu are capacitate fermentativă (Kreger-van 1970).

Debaryomyces hansenii (Zopf) Lodder și Kreger-van Rij. Lodder și Kreger-van Rij (1952) au indicat *D hanseii* (Zopf) Lodder și Kreger-van Rij ca specie tip a genului *Debaryomyces*. *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder și Kreger-van Rij crescute pe mediu cu extract de malț timp de 2 zile la 25°C au celule sferice sau ușor ovale, dispuse izolat, în perechi sau în lanțuri scurte, cu dimensiuni de 2—7 × 2,5—85μm. După menținerea timp de o lună la 17°C, coloniile sînt alb-gri spre gălbui, moi, lucioase, catifelate, parțial sau în totalitate zbîrcite. Cultivate pe mediu de făină de cartof și porumb se poate diferenția un pseudomiceliu primitiv și numai în mod excepțional este bine dezvoltat.

De obicei conjugarea între celula-mamă și mugurele său precede formarea ascei. Poate avea loc și conjugarea isogamică. Sporii sînt sferici și se evidențiază numai cu microscopul electronic. În mod frecvent se formează un spor și mai rar doi într-o ască. Sporularea a fost evidențiată la 26 tulpini din cele 42 luate în studiu. Temperatura de 20°C stimulează sporularea. Poate fermenta (uneori foarte slab sau deloc) glucoza, galactoza, zaharoza, maltoza și asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza (rareori —), zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, lactoza (sau —) melibioza (rareori —), rafinoza, melezitoza, D-ramnoza (sau —), etanolul, glicerolul, eritritolul (sau —), ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, acizii DL-lactic, succinic și atric. Crește la 37°C (Kreger-van Rij, 1970).

1.2.4. ENDOMYCOPSIS DEKKER

Lodder și Kreger-van Rifj (1952) au desemnat *E. capsulans* (Schionning) Dekker ca specie tip.

Endomycopsis fibuligera (Livder) Dekker. Cultivate pe extract de malț, timp de 2 zile la 25°C, celulele sînt ovale sau alungit-ovale, cu dimensiuni de 4—8 × 6—18 μm. Este de asemenea prezent miceliul, rămuros, septat. Proporția între celulele de drojdie și hife variază cu tulpina. După o lună de menținere la 17°C, se formează o masă groasă, dură, de culoare galbenă. După 2 zile de la însămînțare pe malț, agar și incubare la 25°C, cultura constă din celule înmugurite și miceliu adevărat, mai abundent decît pe extractul de malț. După o lună de menținere la 17°C, cultura devine maro-galbenă, dură, mai mult sau mai puțin zbîrcită (rugoasă), lucioasă, parțial sau total poroasă. Pe mediu agarizat, ce conține făină de cartofi sau

Cu — s-a notat incapacitatea de fermentație și asimilație.

porumb, se formează miceliu adevărat, ramificat septat. Frecvent se formează şi pseudomicelii. Ascele sînt sferice sau ovale, sînt dispuse la capătul hifelor sau de-a lungul lor adesea în grup (ciorchini).

Fermentează glucoza, zaharoza, maltoza şi uneori rafinoza. Asimilează glucoza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza (sau —), rafinoza (sau—), (melezitoza (sau —), etanolul, glicerolul, eritritolul (sau —), ribitolul (sau —), D-manitolul (sau —), D-glucitolul) sau —), α-metil-*D*-Glucozida, salicin, DL-acidul lactic, acidul salicilic (sau —), acidul citric (sau —) inositolul (sau —). Creşte la 37°C (Kreger-van Rij, 1970).

1.2.5. HANSENULA H. ŞI P. SYDOW

Genul *Hansenula* cuprinde 25 de specii, grupate în cinci linii filogenetice (Wickerham, 1970).

1.2.5.1. HANSENULA ANOMALA (HANSEN), H. ET P. SYDOW

Celulele pot varia ca mărime şi formă, chiar dacă aparţin aceleiaşi tulpini. În mod frecvent, celulele sînt sferice sau elipsoidale, izolate, dispuse în perechi sau în grupuri mici. Dimensiunea celulelor variază între 2,4—4,8 × × 2,6—5,2 μ. Tulpinile filamentoase prezintă o mai mare variabilitate morfologică, atingînd lungimi de 30 μ. Coloniile sînt netede, rugoase, răsucite, mate, strălucitoare sau gri. Coloniile netede şi strălucitoare sînt caracteristice tulpinilor proaspăt izolate din natură, iar celelalte forme se întîlnesc la tulpinile menţinute timp îndelungat în laborator. Marginile coloniei sînt de obicei crenate. În culturile bătrîne se pot diferenţia hife, unele puternic ramificate. Celulele extreme ale hiflei pot atinge 20 μ în lungime. Blastosporii sînt în general sferici, ovali şi elipsoidali.

Deoarece *H. anomala* var *anomala* este izolată aproape exclusiv din natură, în stare diploidă, bisexuală, celulele se convertesc direct în asce, care conţin între unul şi patru ascospori. Imediat după eliberare din asce, ascosporii se aglutinează. Sporii sînt heterotalici, iar uneori pot suferi un proces de diploidizare.

Fermentează glucoza, galactoza (ocazional —), zaharoza, maltoza (frecvent slab, ocazional —), rafinoza şi asimilează glucoza, galactoza, (ocazional —), D-riboza (ocazional —), zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, rafinoza, melezitoza, D-xiloza (rar —), etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul (ocazional —), D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, acidul DL-lactic, acizii succint şi citric (Wickerham, 1970).

1.2.5.2. HANSENULA CAPSULATA WICKERHAM

Celulele sînt sferoidale pînă la elipsoidale, izolate şi în pereche, iar ocazional sînt dispuse în mici ciorchini. Celulele au dimensiuni de 0,9—3,4 × × 1,4—3,8 μm. Coloniile sînt albe, gri sau sectoriale alb-gri. De obicei, coloniile sînt strălucitoare, iar după o cultivare continuă, au o formă convexă sau circulară.

Au fost identificate tulpini care nu formează spori, fiind încadrate în rîndul speciilor imperfecte. În mod obişnuit conjugarea are loc între o celulă matură şi mugurele ei şi mai rar între două celule independente. S-au identificat şi tulpini la care conjugarea are loc între o celulă matură şi un mugure

al altei celule. Procesul de conjugare a fost mai frecvent întîlnit la tulpinile care produc un pigment cînd cultura sporulează bine. Ascele de *H. capsulata* conțin nu mai mult de doi spori și peretele ascei se rupe imediat după ce s-au format sporii.

Fermentează glucoza și asimilează glucoza, celobioza, trehaloza, D-xiloza, L-arabinoza, D-riboza, L-ramnoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul. *H. capsulata* crește la 37°C.

1.2.5.3. HANSENULA GLUCOZYMA WICKERHAM

Celulele sînt izolate sau dispuse în perechi și triple. Celulele mai mari și bătrîne formează mici ciorchini. Celulele sînt de la elipsoidale pînă la sferice și au dimensiuni 2,4—6,9 × 3,1—7,3 µm. Se observă numeroși zigoți heterogametici. La aproximativ 2 mm de la margine se observă mulți spori liberi în ciorchine, cu 3 și 4 ascospori. Ascele intacte conțin de la unul pînă la patru spori. Coloniile sînt mari, măsurînd 9 mm în diametru. Au o formă conică, strălucitoare, roz. Nu formează hifle. Coloniile diploide sînt de culoare roz închis, roșu.

Conjugarea are loc în mod frecvent, între celula și mugurele ei, mugurele avînd dimensiunea de 1—5 µm, iar diametrul celulei-mamă este de circa 7 µm. Uneori, conjugarea are loc și între celule independente. După două zile, majoritatea celulelor sporulează. Cele mai multe asce conțin doi spori, dar se întîlnesc și asce cu 3 sau 4 spori. *H. glucozyma* fermentează glucoza și asimilează glucoza, celobioza, trehaloza, D-riboza, L-ramnoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, D-manitolul, D-glucitolul, D-xiloza, acidul citric. Crește la 37°C.

1.2.5.4. HANSENULA HENRICII WICKERHAM

Celulele de la marginea coloniei sînt izolate, dar se întîlnesc și perechi triple, și în mici ciorchini.

Celulele tulpinilor haploide sînt puțin mai mici decît cele diploide, dar mult mai mari decît celulele de *H. minuta*, *H. nonfermentans* și *H. wickerhamii*. Celulele haploide pot fi sferoidale și elipsoidale cu dimensiunea de 3,5—5,2 × × 5,0—6,6 µm. Conjugarea heterogamică are loc între celulele independente. Ascele sînt sferoidale (7,0—7,8 µm). În centrul coloniei se întîlnesc numeroși spori liberi, mari, refractili, dispuși în grupuri de 3 sau 4 spori, iar ocazional în grupuri de pînă la 100 spori. Celulele diploide de la marginile coloniei sînt singure sau grupate cîte două sau în mici ciorchini. Sînt sferice sau elipsoidale cu dimensiuni de 5,2—5,8 µm.

În condiții aerobe, creșterea este moderată și ocazional se formează lanțuri de celule sferice sau elipsoidale de 10—15 celule. Coloniile sînt netede, strălucitoare și adeseori au culoarea roz. După 7—10 zile coloniile devin maro-roșu. Sporularea este abundentă. Sporii sînt mult mai mici decît cei de la speciile *H. minuta*, *H. nonfermentans*, *H. wickerhamii*. După eliberare, sporii cresc în mărime și refractilitate. Coloniile haploide pot fi izolate relativ ușor de cele diploide, după intensitatea culorii. Asimilează glucoza, celobioza, trehaloza, D-xiloza, D-riboza, L-ramnoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucetolul. La 37°C creșterea este moderată, în prezența HCl 10%.

1.2.5.5. HANSENULA MINUTA WICKERHAM

Au fost identificate două forme — mucoidă, sub care probabil se întîlnește în natură, și forma butiroasă, specifică tulpinilor de laborator.

Celulele din marginea coloniilor mucoide măsoară 0,8 μm lățime și 1,4—1,7 μm lungime, iar cele de la forma butiroasă au dimensiunile de 1,5 μm × 1,7—3,4 μm. Celulele izolate sau dispuse în perechi sînt elipsoidale și sferice. Zigotul rezultă prin conjugarea celulei cu mugurele său. Celulele mai mari sînt de aproximativ 3,8 μm în diametru, iar mugurele de 0,6 μm. Numărul de spori într-o ască depinde de mediul de cultură. În mod frecvent, o ască conține 2—3 spori, dar se întîlnesc și asce cu 1—4 spori. În momentul eliberării formează ciorchini, cresc în mărime și devin refractili.

Coloniile au diametrul de aproximativ 4 mm, sînt strălucitoare, alb-gri și nu se diferențiază hife. Coloniile formei butiroase sînt foarte mici și ating după 5 zile 1,0—1,5 mm.

H. minuta este o specie homotalică, stare demonstrată de conjugarea celulei cu mugurele său. Mugurele este neobișnuit de mic, în comparație cu diametrul celulei din care provine. Fermentează glucoza și asimilează glucoza, celobioza, trehaloza, D-xiloza, D-riboza, etanolul (ușor), glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul (Wickerham, 1970).

1.2.5.6. HANSENULA NONFERMENTANS WICKERHAM

Celulele de la marginea coloniei sînt singure (izolate), în perechi și în mici ciorchini. Majoritatea celulelor sînt elipsoidale, iar cele mai mari (1,4—2,1 × 2,6—3,1 μm) sînt sferice. Coloniile, după 7 zile, au diametrul de 4 mm, sînt netede, foarte strălucitoare și de la mucoide pînă la butiroase. Ele sînt convexe pînă la conice, alburii, întregi și fără hife. Coloniile crescute pe extract de drojdii — extract de malț, după 3—4 zile sînt mici, netede, strălucitoare și butiroase, iar la 5 zile au diametrul de 2 mm. Indiferent de condițiile de creștere, aerobe sau anaerobe, nu se formează hife. Celulele cele mai tinere din zona anaerobă sînt foarte mici, elipsoidale sau cilindrice, în timp ce celulele mai bătrîne, din imediata apropiere a punctului original al inoculării sînt mult mai mari și sferice. Însămînțate pe extract de malț celulele diploide se pot transforma în asce ce conțin, în mod frecvent, 2—3 spori și mai rar 1—4, cu dimensiuni de 1,4 × 1,8 μm. După eliberarea lor din asce, unii spori pot atinge 2,4 μm în diametru. Sporii liberi se pot uni în ciorchini. Conjugarea are loc de obicei între celula-mamă și mugurele său ocazional între celule independente, prin intermediul tuburilor de conjugare. *H. nonfermentans* este o specie homotalică și lipsită de capacitate fementativă. Asimilează glucoza, trehaloză, D-riboza, etanolul, glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-xiloza, acizii succinic și citric. Crește la 37°C (Wickerham, 1970).

1.2.5.7. HANSENULA POLYMORPHA DE MORAIS ET MAIA

Se prezintă în stare haploidă și diploidă. Celulele haploide de la marginea coloniei sînt elipsoidale spre cilindrice, au dimensiuni de 1,0—3,4 × 2,1—4,3 μm și se întîlnesc singure sau în perechi. Celulele diploide sînt sferice și sferoidale și au diametrul de 3,4—5,2 μm. Celulele diploide aglutinează și formează ciorchini. Coloniile sînt netede, strălucitoare, butiroase, întregi și lipsite de hife. Coloniile care sporulează devin roz sau roșii. Nu se formează hife, indiferent de condițiile de creștere, aerobe sau anaerobe.

În natură, *H. polymorpha* există în mod predominant sau chiar exclusiv în stare haploidă. În timpul izolării, celulele haploide produc numeroase celule diploide. Coloniile haploide sînt albe sau roz, iar cele diploide sînt roşii. Culoarea evidenţiază abundenţa ascosporilor. Conjugarea celulelor haploide se realizează între celulă şi mugurele său şi mai rar între celule independente. Ascosporii sînt mici, semisferoidali şi în număr de 1—4 per ască. Ascele sînt sferice sau sferoidale şi se rup la maturarea sporilor. Ascosporii sînt mai rezistenţi la căldură în comparaţie cu ascosporii altor specii de *Hansenula*. Fermentează glucoza şi asimilează glucoza, zaharoza, maltoza, celobioza (ocazional —), trehaloza, melezitoza, D-xiloza, (rar —), D-roboza, L-ramnoza, (sau —), etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, galactitolul (uneori —), D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, acizii succinic şi citric (ocazional —). Creşte la 37°C (Wickerham, 1970).

1.2.5.8. HANSENULA WICKERHAMII CAPRIOTTI

Celulele haploide de la periferia coloanei sînt singure (izolate) şi în perechi. Forma lor este sferică şi au dimensiuni de 1,7—2,4 μm. Celulele diploide sînt sferice pînă la elipsoide, cu dimensiuni de 2,6—3,5 μm. Coloniile ambelor forme sînt mici, netede, strălucitoare, butiroase, întregi şi nu conţin hife. *H. wickerhamii*, în mod normal, este haploidă şi homotalică. Culturile haploide sporulează puţin pe mediu extract de malţ şi mult mai puţin pe extract de drojdii + extract de malţ. Totuşi, celulele diploide vegetative sînt produse în număr foarte mic şi pot fi izolate de pe mediul cu extract de drojdii + extract de malţ sau de pe mediul cu extract de malţ. Coloniile diploide se pot deosebi de cele haploide după culoarea lor roşie. Celulele diploide se caracterizează printr-o abilitate diferită de sporulare, unele din ele suferă acest proces de conversie în procent ridicat (80%). Ascele au diametrul de aproximativ 3,5 μm. Ascosporii în formă de pălărie sînt subţiri, cu diametrul de 1,5—1,7 μm. După eliberarea din ască îşi măresc dimensiunile. În fiecare ască sînt 3 sau 4 spori. Nu are capacitate fermentativă. Asimilează glucoza, L-sorboza, trehaloza, D-xiloza, D-riboza, L-ramnoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, D-arabinoza (Wickerham, 1970).

1.2.6. KLUYVEROMYCES VAN DER WALT

Genul *Kluyveromyces* cuprinde 18 specii. *K. polysporus* a fost desemnată ca specie tip a genului. În producţia de proteine sînt folosite *K. fragilis* şi *K. lactis*.

1.2.6.1. KLUYVEROMYCES FRAGILIS (JÖRGENSEN) VAN DER WALT

Celulele crescute pe extract de malţ timp de 3 zile la 28°C sînt subglobulare, elipsoidale, spre cilindrice, cu dimensiuni de 2,0—6,0 × 3,5—10,0 μm. Se pot întîlni celule singure (izolate), în perechi sau în lanţuri scurte. De obicei se formează un pseudomiceliu, într-o proporţie mai mare sau mai mică. Cultura este butiroasă, de culoare crem sau maronie, lucioasă, relativ plată, netedă spre încreţită, ocazional împărţită în sectoare. Marginea poate fi netedă, ondulată sau lobiformă. După menţinerea timp de o lună la temperatura camerei, cultura este maro-bej spre maro-gri, lucioasă spre estompată, cati-

felată, împărțită pe sectoare, încrețită sau rugoasă. Marginea poate fi ondulată lobiformă și ocazional mărginită de pseudomiceliu.

Culturile crescute pe mediu cu făină de porumb formează, de obicei, un psudomiceliu abundent, care se dezvoltă mai bine în condiții anaerobe. Pseudomiceliul poate fi rudimentar sau poate fi puternic ramificat. Ocazional se pot forma blastospori, dispuși în mici ciorchini în lungul celulelor filamentoase. De obicei, celulele vegetative diploide se transformă direct în ască. În același timp, conjugarea celulelor independente sau autogamia poate preceda formarea ascelor ce conțin 1—4 ascospori. Ascosporii reniformi sau alungiți cu capete obtuze sînt eliberați rapid din asce și tind să aglutizeze.

Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza, maltoza, lactoza, rafinoza, inulina (ocazional slab) și asimilează compușii de carbon din glucoză, galactoză, L-sorboză (sau —), zaharoză, maltoză, celobioză, lactoză, rafinoză, insulină, D-xiloză, L-arabinoză, D-riboză (sau —), etanol, glicerol, ribitol (rar —), D-manitol), D-glucitol, acid DL-lactic, acid succinic, acid citric (sau —).

Celulele cresc la 37°C și sînt rezistente la cicloheximidă (Van der Walt, 1970).

1.2.6.2. KLUYVEROMYCES LACTIS (DOMBROWSKI) VAN DER WALT

Celulele de *K. lactis* crescute pe extract de malț, timp de 3 zile, sînt de obicei sferice, elipsoidale sau ocazional cilindrice, cu dimensiuni de 2,0—6,5 × × 3,8—8,0 μm. Pot fi întîlnite singure (izolate), în perechi sau, ocazional, în mici ciorchini sau mase aglutinate. Se pot observa și celule amoeboide. Cultura este butiroasă; de culoare crem sau maronie, ocazional cu o tentă roz, lucioasă, netedă și ocazional împărțită în sectoare. Marginea este întreagă spre ondulată, ocazional lobiformă. După menținerea timp de o lună la temperatura camerei, cultura este de culoare maroniu-crem spre gri-bej, frecvent cu o tentă roz, plată, catifelată, ocazional împărțită în sectoare. Marginea este întreagă, ondulată sau lobiformă. Pe mediu ce conține făină de porumb se formează un pseudomiceliu rudimentar. În condiții aerobe poate lipsi și este mai bine dezvoltat în condiții anaerobe. Conjugarea celulelor independente precede de obicei formarea ascelor sau celulele vegetative diploide se pot transforma direct în asce. Numai rareori autogamia precede formarea ascei. Sporii sînt sferici spre elipsoidali. În fiecare ască se diferențiază 1—4 ascospori care sînt rapid eliberați din ască și tind să aglutineze.

Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza (rareori —), lactoza, rafinoza (rareori —) și rareori (ușor) maltoza și trehaloza. Asimilează compușii de carbon din glucoză, galactoză, L-sorboză (sau —), zaharoză, maltoză (sau —), celobioză, trahaloză, lactoză, etanol, glicerol, ribitol (sau —), D-manitol, D-glucitol, rafinoza (rareori —), melezitoza, inulina (sau —), D-xiloză (sau —), α-metil-D-glucozidă (sau —), acidul DL-lactic (sau —), acidul succinic, Este rezistentă la cicloheximida (Van der Walt, 1970).

1.2.7. LODDEROMYCES VAN DER WALT

Genul *Lodderomyces* cuprinde o singură specie — *L. elongisporus.*

Lodderomyces elongisporus (Recca și Mrak) Van der Walt. Celulele de *L. elongisporus*, crescute pe extract de malț, timp de 3 zile, la 28°C, sînt

elipsoidale spre cilindrice, ocazional alungite, cu dimensiuni de 2,5—6 × 4,0—9,5 μm, singure, (izolate), în perechi și ocazional formează lanțuri scurte sau mici ciorchini. Se poate diferenția și pseudomiceliu. Cultura este butiroasă, de culoare crem spre crem-gri, lucioasă, de obicei plată, catifelată, netedă pînă la verucoasă și încrețită în centru. Marginea este întreagă. După menținerea la temperatura camerei, timp de o lună, cultura este alb-crem spre crem, lucioasă, catifelată, încrețită spre rugoasă în centru. Marginea poate fi întreagă sau mărginită de pseudomuceliu. Pe mediu ce conține făină de porumb se formează un psaudomiceliu bogat, care poate fi ramificat, iar blastosporii pot fi grupați în ciorchini sau în ciorchini ramificați, dispuși în lungul celulelor pseudomiceliului. Celulele diploide vegetative se transformă direct în asce, care conțin unul sau ocazional doi ascospori. Este o specie homotalică. Fermentează glucoza (lent), galactoza (slab sau —), trehaloza (lent) și poate fermenta lent și slab (sau —) zaharoza și maltoza. Asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, trehaloza, melezitoza, D-xiloza (ocazional lent), etanolul, glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, acizii succinic și citric. Crește la 37°C și este rezistentă la ciclohexamidă (Van der Walt, 1970).

1.2.8. METSCHNICOWIA KAMIENSKI

În genul *Metschnicowia* sînt încadrate 5 specii : *M. bicuspida, M. krissii' M. pulcherrima, P. reukaufii, M. zobellii. M. bicuspida* a fost desemnată ca specie tip a genului.

1.2.8.1. METSCHNICOWIA BICUSPIDA (METSCHNIKOFF) KAMIENSKI

În cadrul speciei *M. bicuspida* au fost descrise patru varietăți : *M. bicuspinda* var. *bicuspida ; M. bicuspida* var. *australis* Fell și Hunter ; *M. bicuspida* var. *californica* Pitt și Miller ; *M. bicuspida* var. *chathamia* Fell și Pitt.

Metschnicowia bicuspida var bicuspida. Celulele crescute pe extract de malț, timp de 3 zile, la 25°C sînt elipsoidale sau cilindrice, cu dimensiuni de 3—8×3—13 μm. La unele tulpini celulele sînt globulare cu dimensiuni de 5—8 μm sau alungite (25—35 μm). Se reproduc prin înmugurire multipolară. După o lună se întîlnesc celule globulare mari, cu dimensiuni de 2—10 μ, refractile și conținînd globule lipidice.

Coloniile în cultură sînt de culoare crem, cu suprafața catifelată sau la unele tulpini suprafața coloniei este rugoasă, cu marginea întreagă sau crenelată.

Pe mediu ce conține făină de porumb se formează un pseudomiceliu rudimentar. Ascele sînt, în general, clavate dar se întîlnesc și forme mai puțin regulate, avînd dimensiuni de 3—7 × 15—45 μm, iar pe medii mai diluate ajung pînă la 60 μm. În fiecare ască se formează doi ascopori, frecvent un ascospor acicular, cu dimensiuni de 0,7—1,1×15—50 μ,.

Tulpinile celor patru varietăți sînt morfologic și fiziologic destul de similare. Varietatea bicuspidă este în general homotalică, deși pot rezulta și haploizi heterotalici (Wickerham, 1964), aparent printr-un mecanism parasexual (Pitt și Miller, 1970). Acești haploizi sînt capabili să se hibridizeze cu celelalte varietăți heterotalice, rezultînd hibrizi care însă sporulează rar·

Unele tulpini ale varietății bicuspida, definite ca *M. Kamienski*, cresc la temperaturi mai scăzute, în timp ce majoritatea tulpinilor pot crește la 30...34°C.

Fermentează glucoza și nu fermentează galactoza, zaharoza, maltoza, trehaloza, lactoza, rafinoza. Asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, D-riboza (ușor sau —), etanolul (sau) — glicerolul (sau —), melezitoza (sau slab), D-xiloza (sau slab), D-manitolul, D-glucitolul, salicinul (sau slab), acidul succinic (sau slab sau —). Tiamina stimulează creșterea. Tolerează NaCl în concentrație de 10—16% (*w/v*) și glucoza 40—45% (*w/v*). Temperatura maximă de creștere este de 27...34°C.

Celelalte varietăți se deosebesc de *M. bicuspida* var *bicuspida* prin următoarele proprietăți. :

— *M. bicuspida* var. *australis* nu fermentează glucoza și asimilează ribitolul (+ sau slab) ;

— *M. bicuspida* var. *californica* asimilează α-metil-D-glucozida și glucano-δ-lactona ;

— *M. bicuspida* var. *chathamia* asimilează α-metil-D-glucozida (Miller și Van Uden, 1970).

1.2.9. PICHIA HANSEN

Klöcker (1912) a desemnat ca specie tip specia *Pichia membranaefaciens*.

Vor fi descrise speciile *E. membranoefaciens*, *P. pastoris*, *P. pinus*, *P. trehalophila*.

1.2.9.1. PICHIA MEMBRANAEFACIENS HANSEN

Celulele de *P. membranoefaciens* crescute pe extract de malț timp de două zile la 25°C sînt ovale, aproape ovale, alungit-ovale sau cilindrice, cu dimensiuni de 2—5,5×4,5—20 μm, singure, în perechi sau în lanțuri. Cultura este catifelată sau zbîrcită. După o lună de menținere la 17°C cultura are același aspect. Prin însămînțarea pe malț, la 25°C, după două zile, celulele sînt ovale, alungit-ovale sau cilindrice, cu dimensiuni de 2—4,5×5—20 μm și-și conservă aspectul. După o lună, la 17°C, cultura este alb-gălbuie spre maro-gălbui, moale, catifelată, parțial sau total zbîrcită. Însămînțată pe mediu ce conține făină de cartof și porumb celulele formează pseudomiceliu bine dezvoltat, cu aspect de copac. În același timp, poate fi foarte redus sau este absent.

Conjugarea poate avea loc între celule de tip opus de împerechere sau între celule de același tip. Sporii sînt sferici sau hemisferici, de dimensiuni variabile. În fiecare ască se diferențiază 1—4 ascospori, care se eliberează relativ ușor. Prezența unui număr mare de spori dă culturii o culoare maro.

Fermentează glucoza (foarte ușor sau deloc) și asimilează glucoza, sorboza (sau—), etanolul, glicerolul (sau—), D-xiloza (sau—), acidul D—L lactic (sau—), acidul succinic (sau—), acidul citric (sau—),. Crește la 37°C (Kreger Van Rij, 1970).

1.2.9.2. PICHIA PASTORIS (GUILLIERMOND) PHAFF

Crescute pe extract de malț, timp de 2 zile, celulele sînt sferice pînă la ușor ovale, izolate sau dispuse în pereche, cu dimensiuni de 2,5—5 × 3,2 6 μm. Celulele ovale pot măsura 5×6,5 μm. După menținerea timp de 3 zile

la 25°C celulele sînt mici (2—4×2,2—5,3 μm) și ovale; dar se întîlnesc și celule mai mari, ovale (5×6,5 μm). După o lună la 17°C, cultura devine crem, moale, catifelată și lucioasă.

Conjugarea între celula-mamă și mugurele său poate preceda formarea ascei. În fiecare ască se formează 1—4 spori, în formă de pălărie care se eliberează ușor. Prezența multor spori dă culturii culoarea maro.

Fermentează glucoza și asimilează glucoza, trehaloza, L-ramnoza, etanolul, glicerolul, D-manitolul, D-glucitolul, acidul succinic și acidul DL-lactic (sau nu). Crește la 37°C (Kreger Van Rij, 1970).

1.2.9.3. PICHIA PINUS (HÖLST) PHAFF

Celulele crescute pe extract de malț timp de două zile la 25°C sînt sferice sau ovale cu dimensiuni de 2—6×3—7,5 μm, singure sau în perechc. Păstrate o lună la 37°C, cultura devine maro-galbenă spre alb-gălbui, moale, catifelată, mucoasă sau uscată, lucioasă și plată. Pseudomiceliul se formează numai la cîteva tulpini cultivate pe mediu ce conține făină de porumb.

Conjugarea între celula-mamă și mugurele său precede formarea ascelor. Ascele se pot diferenția și în absența conjugării. Se formează 2—4 spori/ască sub formă de pălărie. Prezența multor spori dă culturii o tentă roșie.

Fermentează glucoza (sau-) și trehaloza (sau-) și asimilează glucoza, L-sorboza (sau-), celobioza, trehaloza, D-xiloza (sau-), L-arabinoza (sau-), D-arabinoza (sau-), D-riboza (sau-), L-ramnoza (sau-), etanolul (sau-), glicerolul (sau-), eritritolul, D-manitolul, D-glucitolul, acidul succinic (sau-), acidul citric (+ sau -).

Cresc la 37°C (sau —) (Kreger Van Rij, 1970).

1.2.9.4. PICHIA TREHALOPHILA PHAFF, MILLER ȘI SPENCER

Celulele crescute pe extract de malț la 25°C, timp de 2 zile, sînt sferice sau ușor ovale, cu dimensiuni de 2,5—6,5×3—8 μm, singure (izolate) sau dispuse în perechi sau în ciorchini. După 3 zile dimensiunile sînt de 3,2—7,5×4,2—8 μm. Prin menținerea timp de o lună la 17°C, cultura devine maro-gălbuie, moale, catifelată și lucioasă.

Conjugarea între celula-mamă și mugure sau conjugarea isogamică poate precede formarea ascei. În fiecare ască se diferențiază 1—4 spori, care sînt eliberați foarte ușor. Prezența unui număr mare de spori dă culturii o tentă roșie.

Fermentează glucoza și trehaloza (sau slab) și asimilează glucoza, D-riboza, L-sorboza, trehaloza, D-xiloza, L-arabinoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, acidul succinic, acidul citric (Kreger Van Rij, 1970).

1.2.10. WINGEA VAN DER WALT

Wingea robertsii van der Walt. *Wingea robertsii* a fost desemnată ca specie tip pentru genul *Wingea*.

Crescute pe extract de malț timp de 3 zile la 28°C celulele sînt sferoidale pînă la elipsoidale, dispuse singure, în perechi și ocazional în ciorchini, cu dimensiuni de 2,5—7,5×3,0—8,0 μm. Se pot întîlni și celule de dimensiuni

mai mari (10×10 μm). Cultura este butiroasă, colorată crem, relativ plată, moale, netedă. Marginea coloniei poate fi întreagă, ondulată sau puţin lobată. După menţinerea timp de o lună la temperatura camerei cultura devine crem spre crem-maroniu, ocazional cu sectoare maro-deschis spre maro-ciocolatiu în perioada sporulării active. Ocazional prezintă striaţiuni transversale. Autogamia precede formarea ascei şi numai rar diferenţierea ascei este precedată de conjugarea celulelor independente. Fiecare ască conţine 1—4 ascospori. Ascosporii sînt elipsoidali sau lentiformi, galbeni-maro, glabri şi conţin globule lipidice.

Fermentează glucoza, zaharoza, maltoza, trehaloza, rafinoza (1/3), α-metil-D-glucozidul şi asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza maltoza, celobioza, trehaloza, lactoza, rafinoza, melezitoza, D-riboza (slab, sau —), L-ramnoza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, D-xiloza, L-arabinoza, acizii succinic şi citric (Van der Walt, 1970).

B. DROJDII ASPOROGENE (IMPERFECTE)

1.2.11. GENUL CANDIDA BERKHOUT

Genul *Candida* cuprinde peste 80 de specii (van Uden şi Buckley, 1970) dintre care 18 specii : *C. albicans, C. arborea, C. boidinii, C. cariosilgnicela, C. cloacae, C. dulcherina, C. guilliermiondii, C. intermedia, C. lipolytica (Saccharomycopsis lipolytica), C. maltosa, C. melanolica, C. melanophilum, C. parapsilosis, C. pelliculosa, C. robusta, C. rugosa, C. silvicola, C. succifila, C. tropicalis, C. utilis, C. zeylanoides*, se utilizează în industria de sinteză a proteinelor şi aminoacizilor.

Speciile genului *Candida* se prezintă sub formă de celule sferice, ovale, cilindrice. Se înmulţesc prin înmugurire multipolară. Cele mai multe specii şi tulpini formează pseudomicelii, care frecvent se diferenţiază în pseudohife şi blastospori. Se pot forma şi clamidospori. Dintre speciile de *Candida* care se utilizează în industria de biosinteză a proteinelor vom descrie speciile : *C. albicans, C. boidinii, C. guilliermondii, C. intermedia, C. lipolytica, C. parapsilopsis, C. rugosa, C. tropicalis, C. utilis, C. zeylanoides* (Van Uden şi Buckley 1970) (fig. 3).

1.2.11.1. CANDIDA ALBICANS (ROBIN) BERKHOUT

Cultivată pe mediu de glucoză (2%), extract de drojdie (1%), peptonă (2%) şi menţinută timp de 3 zile la 25°C, *C. albicans* prezintă celule globulare sau ovale şi mai rar alungite, cu dimensiunile de 3,5—6×6—10 μm.

După o lună de la formarea coloniilor, acestea sînt crem, strălucitoare, moi şi netede, uşor catifelate. Coloniile mai bătrîne pot deveni moi, dure şi pot prezenta o suprafaţă zbîrcită sau încreţită, uneori cu proiecţii păroase. Ca o caracteristică particulară, tulpinile recent izolate formează pseudomiceliu bine diferenţiat. La aceeaşi tulpină se pot întîlni mai multe tipuri de pseudomicelii. Pseudomiceliile formate pe tulpinile izolate recent poartă ciorchini de blastospori. Terminal sau în poziţii intercalate se întîlnesc celule mari cu pereţi subţiri, rotunde sau sub formă de pară sau sticlă, care se pot transforma în clamidospori. Pseudomiceliile ce se formează pe coloniile bătrîne pot deveni goale. La *C. albicans* se întîlneşte şi miceliu adevărat.

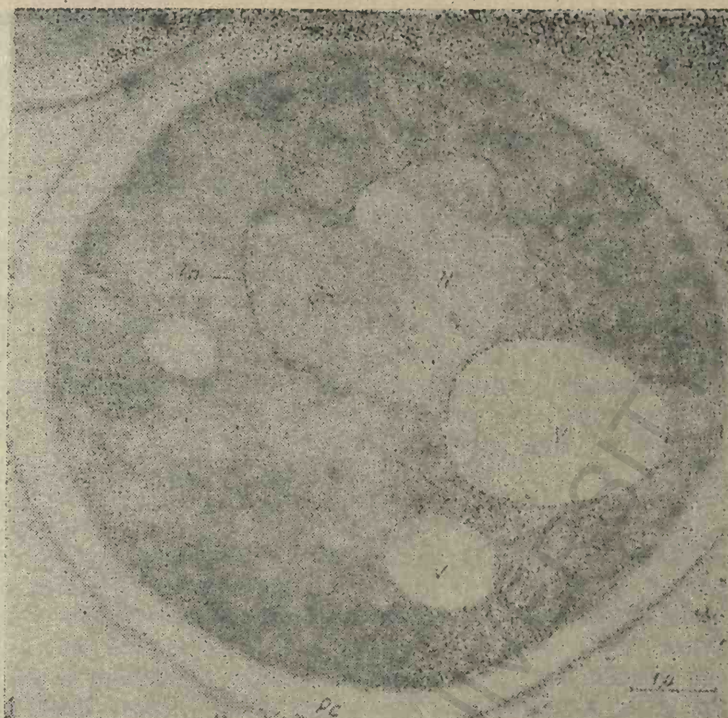


Fig. 3. Ultrastructura și înmugurirea celulei de *Candida robusta* C 38: *C* — citoplasmă; *Cm* — cicatrice mugurală; *Cr* — cromatină; *În* — învelișul nuclear; *Mt* — mitocondrie; *N* — nucleu; *Pc* — perete celular; *pÎn* — porii învelișului nuclear; *RE* — reticul endoplasmic; *V* — vacuolă.

Fermentează glucoza, galactoza (frecvent, slab sau latent), maltoza, trehaloza (sau slab sau deloc) și asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza (sau —), zaharoza, maltoza, trehaloza, melezitoza (sau —), D-xiloza. Poate asimila sau nu etanolul, glicerolul, ribitolul, D-glucitolul, DL-acidul lactic, acidul salicilic, acidul citric, L-arabinoza. Tolerează concentrații de NaCl 8—12% (*w/v*) și crește la temperatură maximă de 43...46°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.2. CANDIDA BOIDINII RAMIREZ

Crescute pe mediu cu glocoză (2%), extract de drojdie (1%), peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt oval-alungite pînă la cilindrice și destul de des curbate, cu dimensiuni de 1,5—3,5 ×7—12 µm. După menținerea timp de o lună la 25°C, coloniile (cultura) sînt colorate în galben-crem, umede, moi, delicate și încrețite. Cultivată pe mediu ce conține făină de porumb formează pseudomicelii care constau din pseudohife scurte, cele mai multe fiind subțiri și fragile, dispuse în lanțuri ramificate, care conferă aspectul unui copac. Pseudohifele sînt aranjate vertical și poartă blastospori ovali.

Fermentează numai glucoza și asimilează glucoza, D-riboza, etanolul, D-xiloza, L-arabinoza (sau —), glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul,

-Dglucitolul, acidul DL-lactic. Asimilează KNO_2, iar biotina stimulează creșterea. Tolerează NaCl în concentrație de 7–10% (w/v). Temperatura maximă de creștere este de 34...36°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.3. CANDIDA GUILLIERMONDII CASTELLANI, LANGERON ȘI GUERRA

Au fost identificate două varietăți: *C. guilliermondii var. guilliermondii* și *C. guilliermondii var carpophila* (Phaff și Miller).

Crescute pe mediu ce conține glucoza (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt ovoide (2–4,5 × 2,5–7 μm) și pot să apară și celule mai mici, cilindrice. După o lună de menținere la 25°C, coloniile (cultura) sînt colorate în galben-crem, moi, strălucitoare și netede sau încrețite. Pe mediu cu făină de porumb se formează pseudomiceliu. Cînd este bine dezvoltat pseudomiceliul este format din pseudohife subțiri, curbate, ce poartă lanțuri ramificate de blastospori ovoizi sau stalagmoizi dispuși în poziții mai mult sau mai puțin verticilate.

Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza, trehaloza, melibioza, rafinoza, inulina și nu fermentează maltoza, celobioza, lactoza și melizitoza. Asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, melibioza, rafinoza, D-riboza (sau —), D-xiloza, L și D-arabinoza, inulina, L-ramnoza (sau —), melezitoza, etanolul (sau —), glicerolul, ribitolul, galactitolul, D-manitolul, acidul DL-lactic (sau —), acidul succinic (sau —), D-glucitolul și acidul citric (sau —).

C. guilliermondii var carpophila se deosebește prin aceea că nu fermentează inulina și nu asimilează melezitoza, L-ramnoza și galactitolul (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.4. CANDIDA INTERMEDIA (CIFERRI, ASHFORD) LANGERON ȘI GUERRA

Crescute pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), după 3 zile la 25°C, celulele sînt ovoide (2,5–5 × 4,5–8 μm) și de obicei formează lanțuri. Sînt întîlnite și celule cilindrice. După menținerea timp de o lună la temperatura camerei, la 25°C, cultura (coloniile) este colorată în crem, moale, netedă sau ușor încrețită. Pseudomiceliul care se formează pe mediu cu făină de porumb constă din pseudohife scurte, aranjate în maniera unui copac, ce poartă blastospori ovoizi.

Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza, maltoza (sau slab), trehaloza (sau slab sau —), rafinoza (sau slab), melezitoza (slab) și asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, lactoza, rafinoza, D-xiloza, L-arabinoza, melizitoza, L-ramnoza (sau —), etanolul (sau —), D-manitolul, D-glucitolul, acizii succinic și citric (sau slab). Biotina stimulează creșterea. Celulele de *L. intermedia* tolerează concentrații de 9–11% NaCl. Temperatura maximă de creștere este 34...37°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.5. CANDIDA LIPOLYTICA (HARRISON) DIDDENS ȘI LODDER

În cazul speciei *C. lipolytica* au fost descrise două varietăți: *C. lipolytica var lipolytica* și *C. lipolytica var deformans* (Zach) Van Uden și Buckley.

C. lipolytica var lipolytica crescută pe mediu de glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%) la 25°C, timp de 3 zile, prezintă celule ovoide cu dimensiuni 3–5 × 5–11 μm, 20 μm lungime, pînă la cilindrice. Crescute

pe glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%) timp de o lună la 25°C, coloniile au o culoare crem, iar unele tulpini sînt zbîrcite, aparent umede și cu aspect mucoid. Se întîlnesc și colonii încrețite mai puternic. Se formează pseudomicelii și micelii adevărate. Pe hife sau pseudohife, terminal sau pleural (uneori în poziții verticilate), se diferențiază blastosporii dispuși singuri sau în pereche. Asilimează glucoza, L-sorboza (sau slab sau —), etanolul, glicerolul, eritrolul, D-manitolul (sau slab) și acizii DL-lactic, succinic (sau slab), citric. Nu are capacitate fermentativă. Tiamina stimulează creșterea. Tolerează concentrația de NaCl 10—14% (*w/v*) și crește la 33... 37°C. În afară de glucidele pe care le asimilează *var lipolytice*, *var deformans* mai asimilează în plus celobioza și salicinul. Temperatura maximă de creștere este de 29...32°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.6. CANDIDA PARAPSILOPSIS (ASHFORD) LANGERON ȘI TALICE

După cultivare pe mediu de glucoză (2%), extract de drojdie (1%), peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt ovoide sau alungit-ovoide cu dimensiunile de 2,5—4×2,5×9 μm. Coloniile sînt crem spre gălbui, lucioase, moi, majoritatea fiind catifelate sau total sau parțial zbîrcite. Pseudomiceliul este subțire și foarte ramificat și diferențiază verticele cu cîțiva blastospori. Se întîlnesc și pseudomicelii formate din celule curbate, gigante.

Fermentează glucoza și ușor sau deloc galactoza și asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza (sau slab), zaharoza, maltoza, trehaloza, melezitoza, C-xiloza, L-arabinoza (sau —), D-riboza (sau slab sau —), etanolul, glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, acizii DL-lactic, succinic și citric (sau slab sau —). Biotina stimulează creșterea și tolerează NaCl în concentrație de 8—17% (*w/v*). Temperatura maximă de creștere este de 39...43°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.11.7. CANDIDA RUGOSA (ANDERSON) DIDDENS ȘI LODDER

Celulele cultivate pe mediu ce conține glucoza (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, sînt ovale spre alungite, uneori în formă de cîrnat sau curbate, cu dimensiuni de 2,5—4×7—15 μm. După menținerea coloniilor la 25°C timp de o lună, coloniile au culoarea de la alb murdar la galben gri, cu aspect zbîrcit. Se întîlnesc și tulpini care formează colonii catifelate și cu aspect lucios. Se formează un pseudomiceliu foarte ramificat. Se pot forma și blastospori. Asimilează glucoza, galactoza, D-xiloza, L-arabinoza, etanolul, L-sorboza, glicerolul, D-manitolul, D-glucitolul, DL-acidul lactic, acidul citric și acidul succinic (ultimele 7 substanțe pot fi asimilate în totalitate sau parțial).

Creșterea tuturor tulpinilor este stimulată de biotină, iar cele mai multe și de piridoxină și tiamină. Tolerează NaCl în concentrație de 4—14% (*w/v*) și crește la temperatura maximă de 37...43°C.

1.2.11.8 CANDIDA TROPICALIS (CAST.) BERKHOUT

C. tropicalis este specia reprezentativă a genului *Candida*. După 3 zile de creștere pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%) la 25°C, celulele sînt ovoide și uneori globuloase, cu dimensiuni de 4—8×5—11 μm. Prin cultivarea timp de o lună la 25°C, coloniile sînt de cu-

loare crem, moi și catifelate, reticulate și zbîrcite. Tulpinile bătrîne pot deveni dure. Se formează din abundență psuedomicelii constituite din pseudohife, care poartă blastoconidii și blastospori dispuși în lanțuri ramificate sau simple. Se pot întîlni și micelii adevărate (Van Uden și Buckley 1970).

Fermentează glucoza, galactoza, zaharoza, maltoza, melezitoza (sau slab), trehaloza (sau slab), asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, D-xiloza, glicerolul, D-manitolul, D-glicitolul și acizii DL-lactic, succinic și citric. Tolerează concentrația de NaCl de 11 — 13% (*w/v*). Temperatura maximă de creștere este de 41...44°C.

1.2.11.9. CANDIDA UTILIS (HENNEBERG) LODDER ȘI KREGER VAN RIJ

Crescute pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%) timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt ovoide pînă la cilindrice și cu dimensiuni cuprinse între 3,5—4,5 ×7—13 µm. Crescute pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%), peptonă (2%) timp de o lună la 25°C, coloniile de la majoritatea tulpinilor au culoarea gri spre crem, sînt lucioase, moi, catifelate. Culturile obținute pe mediu de făină de porumb formează un pseudomiceliu primitiv, constituit din lanțuri și ramificații de pseudohife scurte și celule ovale.

Fermentează glucoza, zaharoza și rafinoza și asimilează carbonul din glucoză, maltoză, zaharoză, celobioză, trehaloză (sau slab), rafinoză, melezitoză, inulină, D-xiloză (sau slab), etanol (sau slab), glicerol, D-manitol (sau slab sau —) și din acizii DL-lactic, succinic (sau slab) și citric. Cele mai multe tulpini sînt stimulate de tiamină, dar sînt și tulpini independente de vitamine. Tolerează concentrații de NaCl de 6—8% (*w/v*) și cresc la temperatura maximă de 39...43°C.

C. utilis este utilizată frecvent în producerea drojdiilor alimentare și furajere. Prezintă avantajele că poate folosi pentozele ca sursă de carbon și energie și este lipsită de exigențe foarte stricte ca sursă de azot.

C. utilis este utilizată în fabricile de drojdie furajeră și alimentară din S.U.A., fosta U.R.S.S., Germania, Canada, România etc. Uneori se cultivă cu *C. tropicalis* în proporții diferite, în funcție de glucidele prezente în mediul de cultură. *C. utilis* și *Sacch. cerevisiae* reprezintă și o sursă valoroasă de lipide, similare cu grăsimile vegetale și animale folosite în hrana omului.

1.2.11.10. CANDIDA ZEYLANOIDES (CASTELLANI) LANGERON ȘI GUERRA

Cultivate pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%) timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt ovale sau alungit-ovale și au dimensiuni cuprinse între 1,5—5,0 ×4,0—10,0 µm. După menținerea timp de o lună la 25°C, coloniile sînt de culoare crem spre galben, moi, catifelate și ușor zbîrcite. Pe mediu de făină de porumb formează pseudomiceliu constituit din lanțuri ramificate de pseudohife. Lateral sau vertical se diferențiază lanțuri de blastospori.

Asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, etanolul, trehaloza glicerolul ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, acizii DL-lactic și citric. Tolerează concentrații de NaCl de 11—13% și crește la temperatura maximă de 32...34°C (Van Uden și Buckley, 1970).

1.2.12. CRYPTOCOCCUS KÜTZING EMEND. PHAFF SPENCER

Ca specie tip a acestui gen a fost stabilită *Cryptococcus neoformans* (Lodder şi Kreger-van Rij, 1952), *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin.

Crytococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin. Crescute pe extract de malţ, timp de 3 zile, celulele sînt în general sferice sau globuloase, singure (izolate) sau dispuse în pereche şi mai rar în grupuri mici. La unele tulpini celulele au dimensiuni de 3,5—7,0×3,7—7,9 μm, în timp ce celulele altor tulpini sînt mai mici, măsurînd 3,0—5,2×3,3—5,5 μm. Celulele crescute timp de 3—5 zile sînt globuloase pînă la sferice, cu diametrul de 2,5—7,5 μm. După menţinerea la temperatura camerei cultura are culoarea crem, uşor roz sau maro-gălbui, iar coloniile sînt lucioase şi catifelate. Nu formează pseudomicelii.

Asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza (sau —), zaharoza, maltoza, celobioza (ocazional uşor), trehaloza, rafinoza (ocazional uşor), melezitoza, D-xiloza, L-arabinoza (uneori uşor sau nu o asimilează), D-arabinoza (uneori lent). Creşte la 37°C (Phaff şi Fell, 1970).

1.2.13. KLOECKERA JANKE

În genul *Kloeckera* sînt incluse patru specii şi două varietăţi : *K. africana, K. apiculata, K. corticis, K. javanica, K. javanica* var *javanica, K. javanica* var *lafarii.*

K. apiculata a fost descrisă ca specie tip a genului.

Kloeckera apiculata (Reess Emend. Klocker) Janke. Cultivate pe extract de malţ timp de 3 zile la 25°C, celulelele au forma unei lămîi ovale sau alungite, singure (izolate), în perechi sau ocazional în grupuri de 3—4. Dimensiunile sînt de 1,4—5,3×2,6—12,2 μm. Se reproduc prin înmugurire bipolară pe o bază relativ largă.

Însămînţate pe malţ şi păstrate la temperatura camerei timp de o lună, majoritatea tulpinilor sînt gri, dar se întîlnesc şi tulpini de culoare gălbui spre crem. Coloniile sînt de obicei catifelate, lucioase, cu marginea întreagă pînă la neregulată. Majoritatea tulpinilor au o regiune centrală joasă şi fine striaţii radiale şi se întîlnesc şi tulpini a căror colonii prezintă o suprafaţă uşor mai grosolană şi ocazional se observă cratere mici.

În mod obişnuit, pseudomiceliul este absent, dar sînt şi tulpini care dezvoltă un pseudomiceliu primitiv, rămuros cu aspect de copac.

Fermentează glucoza şi asimilează glucoza şi celobioza. Tiamina, niacina, acidul pantotenic, piridoxina, botina şi inositolul stimulează creşterea (Phaff, 1970).

1.2.14. RHODOTORULA HARRISON

Speciile genului *Rhodotorula* prezintă celule sferice, ovoidale sau elongate şi se reproduc prin înmugurire multipolară. Ocazional tulpini ce aparţin diverselor specii pot forma clamidospori asemănători cu celulele şi/sau pseudo sau hife adevărate de lungimi diferite. Culturile tinere sintetizează pigmenţi carotenoizi roşii şi/sau galbeni. Drojdiile din genul *Rhodotorula* sînt larg răspîndite în natură, fiind întîlnite pe fructe, în must şi în sucurile de fructe. Genul *Rhodotorula* cuprinde 9 specii şi 4 varietăţi : *R. aurantiaca, R. glutinis, R. graminis, R. lactosa, R. marina, R. minuta, R. pallida, R. pilimanoe, R. rubra.*

Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison. A fost desemnată de Harrison (1928) ca specie tip a genului *Rhodotorula*.

Rhodotorula glutinis var. glutinis. Celulele crescute pe extract de malț timp de 3 zile la 23°C sînt ovoidale sau globulare, cu dimensiuni de 2,3—5,0 × ×4,0—10 μm. La unele tulpini se întîlnesc și celule mai alungite, cu lungimea de 12—16 μm. După o lună coloniile devin roz spre portocaliu. Suprafața coloniei sau culturii variază de la catifelat, adesea cu striații fine transversale, pînă la zbîrcită și cu aspectul foarte lucios sau semilucios. Textura variază de la mucoasă pînă la ușor dură. Secțiunea este plată spre larg-convexă cu marginea neregulată spre întreagă. Uneori, se diferențiază un pseudomiceliu.

În culturile crescute pe mediu cu făină de porumb, în general, pseudomiceliul lipsește sau este rudimentar. În ocazii rare se pot forma pseudohife bine dezvoltate sau hife adevărate. Uneori, unele tulpini produc clamidospori mari, pigmentați puternic.

Asimilează glucoza, galactoza (uneori ușor sau —), L-sorboza (sau —), zaharoza, maltoza, celobioza (ocazional —), trehaloza, rafinoza (rar —), melizitoza, D-xiloza (sau ușor), D-riboza (sau —), L-ramnoza (sau —), etanolul (rar —), glicerolul (rar —), ribitolul (rar —), D-manitolul (rar —), D-glucitolul (rar —), α-metil-D-glucozid (rar —), DL-acid lactic (ușor sau —), acidul succinic, acidul citric (sau —), L-arabinoza (sau —), D-arabinoza (sau —). Temperatura maximă de creștere 29. . .39°C.

Rhodotorula glutinis var. dairenensis. Varietatea *dairenensis* este similară varietății *glutinis*, cu deosebire că *var dairenensis* asimilează nitritul (ușor sau moderat), iar nitratul este utilizat foarte slab. Pentru creștere este necesară timina. Celulele crescute pe extract de malț au dimensiunile de 2,5—5,0 × 3,5 — 5,2 μm (Phaff și D. G. Ahearn, 1970).

1.2.15. TORULOPSIS BERLESE

Celulele sînt globulare sau ovale și mult mai rar alungite. Se reproduc prin înmugurire multipolară. Pseudomiceliile sînt rudimentare sau absente. Genul *Torulopsis* cuprinde 36 de specii, din care 8 sînt folosite în întreprinderile de sinteză proteică *(T. glopengiesseri, P. metanolovescens, T. molischiana, T. nemodendra, P. nitratophila, P. pinus, P. ratilis, P. sonorensis).*

1.2.15.1. TORULOPSIS GLOPENGIESSERI (HARRISON) LODDER

Crescute pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt ovoide pînă la cilindrice și au dimensiunile de 1,5—2,5 × 3,5—6 μm.

Fermentează glucoza și zaharoza și asimilează glucoza, galactoza, celobioza, rafinoza, glicerolul, D-manitolul, D-glucitolul. Biotina stimulează creșterea. Tolerează clorida de sodiu (5—6% *w/v*) și crește la temperatura maximă de 31 . . .32°C (Van Uden și Vidal-Leiria).

1.2.15.2. TORULOPSIS MOLISCHIANA (ZIKES) LODDER

Celulele crescute pe mediu de glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, sînt ovale pînă la aproape sferice (2—5 × 3—6 μm), izolate, în perechi sau scurte lanțuri. Uneori, apar și celule elongate. Nu formează pseudomicelii.

Fermentează glucoza, celobioza și trehaloza și asimilează glucoza, maltoza, celobioza, trehaloza, melezitoza, D-xiloza, D și L-arabinoza, D-riboza, etanolul, glicerolul, D-manitolul, D-glucitolul. Biotina, piridoxina și tiamina stimulează creșterea și tolerează clorida de sodiu în concentrație de 3—4% (*w/v*). Temperatura maximă de creștere este de 44...45°C.

1.2.15.3. TORULOPSIS NITRATOPHILA SHIFRINE ȘI PHAFF

După 3 zile de incubare la 25°C în extract de malț, celulele de *T. nitratophila* sînt ovale pînă la sferice, izolate sau dispuse în perechi și în mici ciorchini cu dimensiuni de 1,8 - 4,4 × 2,1 - 5,2 μm. Pe mediu cu glucoză (2%) extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), celulele sînt ovoide și de dimensiuni 2—3,5×2,5—5 μm.

Fermentează glucoza, trehaloza și galactoza (ușor) și asimilează glucoza, galactoza, L-sorboza, trehaloza, D-xiloza, L-arabinoza (ușor), D-riboza, L-ramnoza (latent), etanolul (latent), glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul. Tiamina stimulează creșterea. Tolerează clorida de sodiu 5—6% (*w/v*) și crește la temperatura maximă de 30...37°C (Van Uden și Vidal-Leiria, 1970).

1.2.15.4. TORULOPSIS PINUS LODDER ȘI KREGER-VAN RIJ

Crescute pe mediu cu glucoză (2%), extract de drojdie (1%) și peptonă (2%), timp de 3 zile la 25°C, celulele sînt globuloase și au 3—4 μ.

Asimilează glucoza, trehaloza, D-xiloza, D-riboza, etanolul, glicerolul, eritritolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, acidul citric (ușor). Tiamina stimulează creșterea. Tolerează clorida de sodiu în concentrație de 4—5% (*w/v*) și cresc la temperatura de 29...30°C. În diferite întreprinderi de biosinteză proteică se mai folosesc: *T. metanolovescens*, *T. nemodendra*, *T. ratilis*, *T. sonorensis* (Van Uden și Vidal-Leiria, 1970).

1.2.16. TRICHOSPORON BEHREND

Genul *Trichosporon* a fost introdus de Behrend în anul 1890 și cuprinde 8 specii: *T. aculeatum*, *T. capitatum*, *T. cutaneum*, *T. fermentans*, *T. inkin*, *T. penicillatum*, *T. pullulans*, *T. variabile*.

Trichosporon cutaneum. *T. cutaneum* a fost stabilită ca specie tip a genului.

Celulele crescute pe mediu cu glucoză, extract de drojdie și peptonă diferențiază miceliu adevărat și astrospori, a căror lățime și lungime este extrem de variabilă. Celulele sînt globulare, ovale, elipsoidale sau pot prezenta și alte forme bizare. Mărimea lor este de 3,5—7×3,5×14 μm. Înmugurirea poate fi abundentă sau absentă și poate avea loc pe o bază îngustă sau largă și este stimulată de agitarea culturii. După menținerea timp de 3 zile la 25°C, se formează o peliculă de culoare crem sau albă, catifelată, rugoasă sau încrețită, subțire sau groasă, uneori avînd tendința să se scufunde în mediu. În absența unei pelicule, uneori, se formează un inel, care poate varia de la incomplet la unul gros, rugos.

După o lună de menținere la 25°C pe mediu cu glucoză, extract de drojdii, peptonă-agar, cultura este albă sau gălbuie spre crem închis. Arareori are o tentă ușor maronie. Suprafața este netedă, catifelată, zbîrcită, negoasă sau

încrețită, umedă, lucioas sau strălucitoare, cu o structură moale pînă la dură, convexă cu marginea întreagă sau neregulată. Cultivate pe mediu cu făină de porumb agarizat formează un miceliu abundent, iar artrosporii au mărime variabilă, adesea cu o citoplasmă optic densă. Artrosporii sînt în număr mare sau lipsesc. Frecvent se observă diferențierea unui pseudomiceliu, care poate fi bine dezvoltat, cu blastosporii aranjați în lanțuri și ciorchini. În unele culturi blastosporii cresc direct din hife sau din artrospori, singuri (izolați), în mici lanțuri sau sînt încolăciți. Numărul lor este mic sau mare și au o citoplasmă optic densă. În alte culturi miceliul poartă numai celule terminale sau intercalare, rotunde sau ovale, care se pot întîlni singure sau în mici lanțuri. Aceste celule prezintă o citoplasmă optic densă și cel puțin unele dintre ele se înmulțesc prin înmugurire. În altele izolate, miceliul și atrosporii pot lua o formă bizară. Se pot întîlni și blastospori. Se întîlnesc și celule gigante, globuloase sau de forme bizare, în special pe mediul cu glucoză și făină de cartof.

Endosporii asexuali se formează prin clivare protoplasmică. Celulele globulare, elipsoidale sau în formă de pară, pot conține 1—6 (sau mai mulți) endospori, de mărimi variate, globulari sau elipsodali. Endosporii se formează în culturi tinere, însămînțate pe mediu cu glucoză, extract de drojdie și peptonă. Capacitatea de a forma endospori prin clivaj protoplasmic a fost aparent pierdută după cîteva transferări. Se întîlnesc și endospori formați prin înmugurire internă. Endosporii pot fi observați în culturi după 2 săptămîni, la 25°C și după o săptămînă la 25°C în culturile însămînțate în pantă.

Specia *T. cutaneum* nu are capacitate fermentativă.

Asimilează glucoza, galactoza (rareori —), L-sorboza (sau —), zaharoza (rareori —), maltoza (rareori —), celobioza (rareori —), trehaloza (sau —), lactoza, melibioza (sau —), rafinoza (sau —), melizitoza (sau —), D-xiloza, L-arabinoza (rareori —), D-arabinoza (rareori —), DL-acidul lactic (sau —), acidul citric (sau —), inositolul (rareori —). Tiamina și biotina stimulează creșterea. Temperatura maximă de creștere este de 29. . .41°C (Carmo-Sansa, 1970).

C. DROJDII DIN GRUPUL YEAST-LIKE

1.2.17. LEUCOSPORIDIUM FELL, STATZELL, HUNTER ȘI PHAFF

Genul *Leucosporidium* cuprinde 7 specii : *L. antarticum, L. capsuligenum, L. frigidum, L. gelidum, L. nivalis, L. scottii, L. stokesii. L. scottii* a fost desemnată ca specie tip a genului.

Leucosporidium scottii Fell, Statzell, Hunter și Phaff. Celulele de *L. scottii* crescute pe extract de malț timp de 3 zile la temperatura camerei, sînt ovale spre alungite, cu dimensiuni de 1,3—6,7 ×4,0—16,1 μm, de obicei singure sau dispuse în perechi. Reproducerea se realizează prin înmugurire apicală. După 3 zile de creștere pe mediu cu malț agarizat, la temperatura camerei, celulele sînt ovoide pînă la elongate și cu dimensiuni de 1,6—4,0×3,2—12,1 μm. După o lună de creștere, coloniile (cultura) sînt de culoare crem și exclusiv la periferie se diferențiază un miceliu dens. Prin însămînțarea pe mediu ce conține făină de porumb și menținerea timp de 3—5 zile la temperatura ca-

merei, începe să se formeze un pseudomiceliu de tip „Candida". După o lună miceliul poartă ciorchini mari de blastoconidii și este prezent miceliul adevărat și pseudomiceliu de tip „Candida".

În ciclul de dezvoltare se disting două faze miceliene: uninucleată și dicariotică. Ambele tipuri de miceliu se diferențiază din faza de „drojdie". Dicariotul rezultă prin amestecarea celor două tipuri de celule haploide *a* și α. Miceliul uninucleat se dezvoltă dintr-o singură celulă uninucleată, în absența împerecherii.

Conjugarea se realizează în 30 ore, cu o frecvență mai mică de 1%, prin amestecarea celulelor de tip de împerechere *a* și α, pe mediu ce conține făină de porumb. Prin conjugarea celulelor se poate dezvolta miceliu binucleat. După 72 ore miceliul se dezvoltă extensiv cu conexiuni la fiecare sept, iar după 4—7 zile, intercalar sau terminal, se dezvoltă teliospori, cu una sau mai multe structuri între spori și miceliu. Teliosporii sînt sferici, cu pereți groși, avînd un conținut granular și dimensiuni de 7,0—15,1×7,1—16,2 μm.

Cariogamia în teliospori precede germinarea. După 10 zile, teliosporii germinează și nucelul diploid migrează în promiceliu. Meioza are loc în promiceliu, rezultînd patru celule. Fiecare celulă conține un nucleu, care se reproduce mitotic, un nucleu rămînînd în celulă, cel de al doilea în sporidie. Prin înmugurirea sporidiei rezultă colonii ce conțin celule de ambele tipuri de împerechere. Tulpinile autosporulante sînt similare morfologic cu haploizii heterotalici, crescute pe medii cu malț agarizat, extract de malț sau făină de porumb agarizat. Teliosporii se formează pe miceliu ce își are originea într-o celulă individuală uninucleată, în absența împerecherii. Acest miceliu nu formează conexiuni, deși au fost evidențiate și structuri asemănătoare acestora. Teliosporii se formează din celule hifale granulate, de dimensiuni mari. Celulele devin sferice și formează o structură în formă de gît. Teliosporii pot avea una sau mai multe proiecții în formă de mugure, care se dezvoltă în noi teliospori, rezultînd ciorchini de doi-trei spori. Acești teliospori nu sînt atît de abundenți ca cei produși pe miceliu dicariotic.

Celulele tulpinilor autosporale sînt capabile să se conjuge cu celule haploide de tip de împerechere α sau *a*, rezultînd un miceliu dicariotic cu conexiuni strînse, teliospori promiceliu și sporidia. Secvența nucleară a unui hibrid este aceeași ca a unui conjugant α×*a*.

L. scottii este incapabilă să fermenteze glucidele și asimilează glucoza, galactoza (sau —), L-sorboza, zaharoza, naltoza, celobioza, trehaloza, lactoza (rar — sau lent), rafinoza, melizitoza, D-xiloza, L-ramnoza, etanolul. glicerolul, galactitolul, D-manitolul, D-glucitolul (sau rar —), α-metil-D-glucozidul. Temperatura maximă de creștere este de 15...30°C (Fell și Phaff, 1970).

1.2.18. RHODOSPORIDIUM BANNO

În genul *Rhodosporidium* au fost incluse două specii: *R. sphaerocarpum* și *R. toruloides*. *R. toruloides* a fost desemnată ca specie tip a genului (Banno, 1967).

Rhodosporidium toruloides Banno. A fost descoperită de Banno (1963) în colecția Institutului pentru Fermentație din Osaka (Japonia). Însămînțate pe mediu ce conține extract de malț și menținute timp de 4 zile la temperatura camerei, celulele de tip de împerechere α sînt sferice, pînă la ușor ovale, cu dimensiuni de 2—6×4—10 μm. Celulele *a* sînt ovale pînă la elon-

gate, cu dimensiuni de $3-7 \times 5-12$ µm. Celulele autosporulante sînt ovale, cu dimensiuni de $3-7 \times 6-30$ µm şi unele pot forma miceliu adevărat şi teliospori. Crescute pe mediu cu malţ agarizat şi menţinute timp de 4 zile la temperatura camerei, celulele au aceleaşi dimensiuni ca cele crescute pe extract de malţ. Cultura (coloniile) este roz pînă la oranj, netedă şi lucioasă, iar textura este moale. După o lună culoarea se intensifică. Culturile autosporulante au arii maro închis constînd din miceliu adevărat şi teliospori. Culturile α crescute pe mediu ce conţine făină de porumb şi menţinute 2 săptămîni la temperatura camerei au numeroşi ciorchini de pseudomiceliu. Pseudomiceliul de tip de împerechere *a* este, în general, absent şi numai rareori au fost găsite scurte lanţuri ramificate de pseudomiceliu. Tulpinile autosporulante formează un miceliu adevărat cu teliospori.

Faza de „drojdie" sau sporidială este heterotalică. Pe mediu cu malţ-agar, la temperatură camerei, celulele α şi *a* sînt compatibile pentru conjugare în 24 ore şi are loc şi plasmogamia. De la o celulă a perechii de conjuganţi, se dezvoltă un miceliu septat cu conexiuni la sept. Pe acest mediu terminal se dezvoltă teliospori care, eventual, devin angulari, neregulaţi, cu conexiuni la baza lor. După una sau 2 săptămîni, sporii germinaţi produc promiceliu cu unul pînă la trei septe. Celulele sporidiale înmuguresc lateral şi terminal din promiceliu şi sporidia se reproduce prin înmugurire, rezultînd o colonie roz. Sporidiile sînt heterotalice şi capabile să se împerecheze, reluîndu-se ciclul de dezvoltare. Sporidia autosporulantă este produsă pe pseudomiceliu. Celulele sporidiale sînt uninucleate şi se dezvoltă direct în miceliul dicariotic cu conexiuni şi teliospori. Prin germinarea teliosporilor rezultă promiceliu cu ambele tipuri de sporidii : heterotalice şi autosporulante. Celulele sporidiale heterotalice şi autosporulante sînt uninucleate, în timp ce celulele miceliului sînt binucleate. Teliosporii sînt iniţial binucleaţi şi devin uninucleaţi prin cariogamie. La germinarea nucleelor diploide are loc diviziunea meiotică şi rezultă 4 nuclee ale promiceliului.

R. toruloides asimilează glucoza, galactoza (latent), zaharoza, maltoza, trehaloza, rafinoza, melizitoza, inulina, D-xiloza, L-arabinoza, D-arabinoza, D-riboza, etanolul, glicerolul, ribitolul, D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, salicinul, acidul DL-lactic, acizii succinic şi citric (uşor). Celulele cresc bine la 30°C şi mai slab la 35...40°C (Fell, Phaff, Newell, 1970).

1.2.19. SPORODIOBOLUS NYLAND

În genul *Sporodiobolus* sînt incluse două specii : *S. johnsonii* ş. *S. ruinenii*. N y l a n d (1949) a desemnat ca specie tip pe *S. johnsonii*, pe care a identificat-o în anul 1948.

Sporodiobolus johnsonii Nyland. Celulele de *S. johnsonii* crescute pe extract de malţ, timp de 3 zile la 22°C, sînt ovale pînă la elongate şi uneori cilindrice. Unele celule sînt elongate cu una sau mai multe constricţii. Unele celule au o excrescenţă asemănătoare cu un tub, sau poate fi ramificat. Înmugurirea apare pe o bază întinsă şi ocazional cîteva celule poartă stigmată şi balistospori. Celulele sînt în general de $3-4$ µm (diametru mic), ocazional au 5 µm, iar lungimea ajunge la $8-11$ µm. Celulele elongate şi care poartă tub de germinare pot ajunge la 50 µm şi chiar mai lungi. După o lună de la însămînţare pe mediu de malţ agarizat şi menţinută la 25°C, cultura este galben-pal, cu o suprafaţă spiralată. Partea centrală a culturii este lucioasă şi vîscoasă (lipicioasă), dar periferia este atenuată, uscată şi pudrată. În

secţiune este convexă şi marginea este tivită cu hife. În culturile crescute pe mediu cu făină de mălai agarizat, în sectoarele anaerobe, se întîlnesc numeroase celule înmugurite, rar hife septate cu interconexiuni şi un număr limitat de clamidospori. În porţiunile aerobe se observă în principal celule înmugurite şi celule cu sterigme care poartă balistospori. Hife cu conexiuni tind să crească în mediu agarizat.

Celulele de *S. johnsonii* asimilează glucoza, L-sorboza (slab şi latent), zaharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, melizitoza, D-xiloza (slab şi latent), D-arabinoza, etanolul (uneori slab), glicerolul, D-manitolul, D-glucitolul, α-metil-D-glucozidul, acizii succinic şi citric. Asimilează de asemenea KNO_2 şi KNO_3. Celulele cresc la 37°C (Phaff, 1970.

*

* *

Tulpinile de drojdii folosite în industria berii, panificaţie, vin sau producere de alcool, proteine, aminoacizi, vitamine şi alte substanţe biologic-active sînt specifice pentru fiecare domeniu. Ţinînd seama de faptul că, în general, tulpinile industriale sînt poliploide şi/sau aneuploide şi care de cele mai multe ori sînt instabile, obţinerea de noi tulpini cu parametri biologici şi economici superiori, care să asigure randamente ridicate şi produse de calitate superioară, trebuie să constituie o preocupare a tuturor specialiştilor din unităţile industriale (biologi, biochimişti, ingineri tehnologi). Această acţiune este posibilă numai în condiţiile existenţei în fiecare unitate industrială ai unei colecţii de drojdii de laborator şi industriale şi a îmbogăţirii acesteia cu noi specii şi tulpini şi cunoaşterea proprietăţilor biologice (stabilitatea genetică, gradul de ploidie, capacitatea de metabolizare şi asimilare etc.).

Mulţi ani s-au folosit selecţia şi hibridarea ca metode de bază şi unice pentru obţinerea de noi tulpini şi hibrizi sau ameliorarea unor parametrii a celor aflate în producţie. În ultimele decenii, pe măsura înregistrării unor progrese semnificative în cunoaşterea structurii genomurilor nuclear şi mitocondrial şi a elaborării unei hărţi genetice, s-a lărgit gama tehnicilor pentru ameliorarea drojdiilor industriale, utilizîndu-se mutageneza, poliploidia, recombinarea genetică şi transferul de gene.

După cum se ştie, speciile de drojdii industriale sînt în general caracterizate printr-o serie de trăsături care împiedică aplicarea tehnicilor de analiză genetică clasice ca, de exemplu: homotalism/heterotalism, poliploidia, aneuploidia, slaba sau absenţa sporulării şi viabilitatea scăzută a sporilor. Depăşirea sterilităţii se realizează prin împerecherea ascosporilor prototrofi $MAT\text{-}\alpha$ şi MAT_a, fuziunea de protoplaşti, transferul de cromozomi prin complementaţia prototrofică. Prin această ultimă tehnică s-au înregistrat contribuţii valoroase în descifrarea structurii genomului la drojdiile industriale. Acest procedeu se bazează pe avantajul mutaţiei *kar*l-1, care blochează fuziunea nucleară a celulelor împerecheate. Mutaţia *kar*l-1 împiedică cariogamia în celulele fuzionate, cînd este prezentă într-unul dintre nuclee. Acest blocaj are ca rezultat producerea de descendenţi citoducţi, avînd nucleul de la o celulă şi elementele genetice citoplasmatice (extranucleare) de la cealaltă celulă. Citoducţia mediată de *kar*l-1 a fost folosită pentru transferul plasmidei 3 μm între diferite tulpini, iar prin utilizarea unor tulpini marcate poate fi folosită şi pentru transferarea cromozomilor de la drojdiile industriale la tulpinile haploide de laborator. Sterilitatea ridicată şi viabilitatea scăzută a sporilor sprijină concluzia că multe tulpini de drojdii industriale sînt hibrizi amfidiploizi, în care fiecare cromozom există în mai multe forme homeologe.

Obiectul ameliorării variază în funcție de produs și de facilitățile de producție și include: stabilitatea genetică în timp, creșterea eficienței sau productivității, reducerea costului de producție, diversificarea mediilor de cultură, îmbunătățirea calității produselor și obținerea de noi produse (coloranți. hormoni, vaccinuri etc.). Identificarea chiar și a unei singure gene benefice și transferarea acesteia la tulpinile industriale ar influența favorabil proprietățile biologice și implicit calitatea produselor.

Introducerea tehnicilor de manipulare genetică la drojdiile industriale este condiționată de elaborarea hărților genetice la acestea. În momentul de față există o hartă genetică la *S. cerevisiae* ce conține 17 grupe de linkage și 586 gene și se desfășoară intense cercetări pentru elaborarea hărților genetice de la *Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomycopsis (Candida) lipolytica, Kluyveromyces lactis.* În același timp, s-a trecut la cartarea genomului mitocondrial și a hărților de structură fină a genelor *TRP*5, *ade*8, *cyc*1 de la *S. cerevisiae.*

Existența hărților genetice de la tulpinile de drojdii, care se folosesc în producție, este motivată de constatarea că există diferențe de la o tulpină la alta ce aparțin aceleiași specii, dacă nu în privința setului de gene, cel puțin în poziția acestora și a distanțelor dintre genele adiacente.

Studiul comparativ al unui sector din cromozomul 10 de la *S. cerevisiae* și două tulpini de *S. carlsbergensis* sprijină concluzia că genomurile sînt structuri dinamice în care se realizează rearanjamentele ADN ce duc la variații în secvențele de baze în celulele aceluiași organism. În afara elementelor genetice transpozabile, de la procariote și eucariote, pentru care nu s-au stabilit funcții sigure, s-au evidențiat mecanisme ce implică rearanjamentele ADN, cu consecințe în expresia genelor.

De această nouă realitate trebuie să se țină seama în experiențele de ameliorare a drojdiilor industriale sau pentru obținerea de noi tulpini și hibrizi cu proprietăți biologice și parametri economici superiori.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANGHEL I. și colab. *Biologia și tehnologia drojdiilor* vol. I. Editura Tehnică, București 1989.
2. ANGHEL I. și colab. *Biologia și tehnologia drojdiilor* vol. II. Editura Tehnică, București, 1991.
3. BANU C. ș.a. *Biotehnologii în industria alimentară,* Editura Tehnică, București, 1987.
4. CARMO-SOUSA do L. În: *The Yeasts. A. Taxonomic Study,* sub red., J. Lodder, Norther Holland Publishing Company Amsterdam, 1309—1352.
5. FELL J. W., PHAFF H. J. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study,* sub red. J. Lodder, Norther Holland Publishing Company Amsterdam, 1970, 776—802.
6. KREGER-van Rij N.J.W. În: *The Yeasts. A. Taxonomic Study,* sub red. J. Lodder, North Holland Publishing Company Amsterdam, 1970, 129—156, 169—208, 455—554.
7. MENCINICOPSCHI G., KATHREIN I., TEODORU V. *Biotehnologii în prelucrarea produselor agroalimentare.* Ed. Ceres, București, 1987.
8. MILLER M. W., UDEN van N. În: *The Yeasts. A. Taxonomic Study,* sub red., J. Lodder, North Holland. Publishing Company, Amsterdam, 1970, 408—429.
9. ONISCU C. *Tehnologia produselor de biosinteză.* Editura Tehnică, București, 1978.
10. PHAFF H. J., AHEARN D. G. În: *The Yeasts. A. Taxonomic Study,* sub red. J. Lodder, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970, 1187—1223.

11. PHAFF H. F., FELL J. W. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, North Holland, Publishing Company, Amsterdam. 1970, 1088–1145.
12. PHAFF, H. J. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, North Holland Publishigg Company, Amsterdam, 1970, 725–732, 756–766, 822–830, 1146–1160.
13. ROȘU ANA, ANGHEL I., BREZEANU AURELIA. În: *Lucrările celui de al III-lea Simpozion Național de Culturi de Celule și Țesuturi „in vitro"*. București, 1985, 143–159.
14. SASSON A. *Biotehnologiile: Sfidare și promisiuni*. Editura Tehnică, București, 1988.
15. TOPALĂ N. În: *Probleme actuale de biologie*. S.S.B., București, 1986, 202–225.
16. UDEN van N., BUCKLEY H. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970, 893–1087.
17. UDEN van N., VIDAL-LEIRIA M. În: *The Yeats. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, North Holland, Publishing Company, Amsterdam, 1235–1308.
18. WALT van der J. P. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970, 336–378, 403–407, 555–718, 772–775.
19. WICKERHAM L. J. În: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, sub red. J. Lodder, Holland Publishinng Company Amsterdam, 1970, 226–315.

2. NOȚIUNI DE BIOTEHNOLOGIE

O. POPA, A. VAMANU

2.1. UTILIZAREA BILANȚURILOR DE MASĂ ȘI ENERGIE ÎN CARACTERIZAREA BIOPROCESELOR

Bilanțurile de masă și energie au aplicații largi în știință și tehnologie, dar, datorită marelui număr de procese ce concură la creșterea microorganismelor, utilizarea lor la analiza bioproceselor este ceva mai dificilă.

2.1.1. RANDAMENTE DE TRANSFORMARE

2.1.1.1. RANDAMENTUL DE SUBSTRAT

Studiind eficiența obținerii biomasei, Monod (1942) a constatat că greutatea uscată a celulelor produse a fost proporțională cu cantitatea de sursă de carbon consumată, atîta timp cît aceasta a fost factorul limitativ (toate celelalte componente existînd în exces).

Factorul de proporționalitate, denumit randament de substrat, reprezintă cantitatea de substrat consumat pentru obținerea unui gram (mol) de biomasă :

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} [g/g]; [g/mol], \qquad (1)$$

unde

ΔX = conc. biomasei (g/l) ;

ΔS = conc. substratului (g/l) sau (mol/l).

O modalitate de calcul al randamentului de substrat este sugerată în fig. 4.

În cazul în care, în urma determinărilor experimentale, se constată că $Y_{X/S}$ este constant, el poate fi folosit pentru urmărirea și conducerea bioproceselor, permițînd de exemplu estimarea concentrației de biomasă pe baza concentrației de substrat (care este în general mai ușor de determinat).

S-a subliniat necesitatea verificării constanței randamentului, deoarece s-a observat că acesta poate varia în funcție de viteza specifică de creștere.

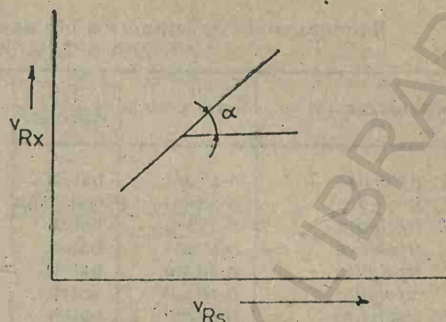
Aceste variații pot fi explicate dacă ținem seama de faptul că o parte din substratul consumat este utilizat pentru „menținere" (vezi 2.2.2.6).

Fig. 4. Calculul randamentului de substrat :

$$Y_{x/s} = \operatorname{tg}\alpha = \frac{V_{Rx}}{V_{Rs}};$$

unde : $V_{Rs} = -\frac{\Delta s}{\Delta t}$ (g/h) viteza de consum a substratului ;

$V_{Rx} = \frac{\Delta x}{\Delta t}$ (g/h) viteza de formare a biomasei.



Pentru procesele aerobe se poate defini, prin analogie cu ecuația (1), un randament față de oxigenul consumat ($Y_{X/O}$). Admițînd că cea mai mare parte din ATP se obține prin fosforilare oxidativă, randamentul bazat pe oxigenul consumat poate reprezenta un indicator al activității catabolice :

$$Y_{X/0}^{mol} = \frac{\Delta X}{-\Delta O_2} \text{ [g/mol]}. \qquad (2)$$

Pornind de la ipotezele :

— singurii produși de metabolism sînt celulele, CO_2 și H_2O ;

— sursa de azot este NH_3,

Mateles (1971) stabilește o relație prin care se poate calcula randamentul raportat la oxigen în funcție de compoziția celulelor (substanță uscată).

Cooney (1973) modifică această relație sub forma :

$$\frac{1}{Y_{X/0}} = \frac{1,5}{Y_{X/S}} + \frac{O'}{100} - \frac{C'}{37,5} + \frac{N'}{38,3} - \frac{H'}{12,5}, \qquad (3)$$

unde : O′, C′, N′, H′ reprezintă procentele elementelor respective în biomasa uscată.

Pentru drojdii, în cazul în care nu se cunoaște compoziția exactă a acestora, consumul de oxigen poate fi aproximat prin :

$$\frac{1}{Y_{X/0}} = \frac{1,5}{Y_{X/S}} - 1,33 \text{[g } O_2\text{/g celule]} \qquad (4)$$

În tabelul 11 sînt prezentate cîteva valori ale randamentului raportat la sursa de carbon și oxigen. Abaterile față de ecuațiile prezentate anterior se datoresc în principal formării produșilor secundari, a căror constituire a fost neglijată la deducerea ecuației (3).

În 1960 Eauchop și Elsden au introdus conceptul de randament raportat la cantitatea de ATP formată în procesele catabolice :

$$Y_{ATP} = \frac{\Delta X}{\Delta ATP} \text{ [g/mol]}. \qquad (5)$$

Pentru procesele anaerobe, acest coeficient are o valoare (aproximativ) constantă de 10,5 g/mol ATP. În cazul proceselor aerobe s-a încercat core-

Tabelul 11

Randamentele de obținere a biomasei pentru cîteva microorganisme (aerob) (Heijnen J. J. și Roels J. A., 1981)

Microorganism	Sursă carbon	Tip cultivare	T (°C)	Sursă azot	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$	$Y_{x/o}$
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	30	NH_3	0,3	0,55	0,65
C. lipolytica	*n*-alcani	continuu	30	NH_3	0,04—0,18	0,43	0,57
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	18	NH_3	0,07	0,55	0,71
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	21	NH_3	0,10	0,60	0,71
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	27	NH_3	0,15	0,53	0,70
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	30	NH_3	0,20	0,52	0,69
C. lipolytica	*n*-alcani	batch	30	NH_3	0,31	0,56	0,47
C. tropicalis	*n*-alcani	continuu	38	NH_3	0,18	0,51	0,57
C. boidinii	metanol	batch	32	NH_3	0,11	0,54	0,50
Candida N 17	metanol	continuu	—	NH_3	0,04—0,08	0,46	0,50
H. polymorpha	metanol	continuu	37	NH_3	0,10	0,48	0,49
H. polymorpha	metanol	continuu	37	NH_3	0,12—0,15	0,50	0,55
C. utilis	etanol	batch	35	NH_3	0,20	0,64	0,80
C. utilis	etanol	batch	32	NH_3	0,50	0,52	0,70
C. utilis	etanol	continuu	30	NH_3	0,06—0,43	0,78	1,04
C. boidinii	etanol	barth	32	NH_3	0,20	0,64	0,87
S. cerevisiae	etanol	batch	30	NH_3	0,09	0,40	0,51
C. utilis	acetat	batch	35	NH_3	0,30	0,44	0,92
C. utilis	glucoză	batch	35	NH_3	0,30	0,62	1,72
C. utilis	glucoză	continuu	30	NH_3	0,08—0,54	0,68	2,04
T. utilis	glucoză	continuu	30	NH_3	0,05—0,40	0,66	1,64
S. cerevisiae	glucoză	continuu	30	NH_3	0,15	0,67	1,14

Obs.: $Y_{X/S}$ este exprimat în echivalenți gram C din biomasă/echivalent g C în substrat;
$Y_{X/O}$ este exprimat în echivalent g C din biomasă/mol. O_2.

larea randamentului Y_{ATP} cu raportul (P/O), care reprezintă eficiența fosforilării oxidative, printr-o relație de forma:

$$Y_{ATP} = \frac{2 Y_{X/o}}{(P/0)}, \tag{6}$$

însă diferențele între datele experimentale și cele teoretice sînt mari, datorită complexității procesului.

2.1.1.2. RANDAMENTE ENERGETICE

În scopul caracterizării mai complete a bioproceselor, s-a încercat definirea unor randamente energetice utile în determinarea eficienței termodinamice.

Randamentul raportat la electronii disponibili în substrat. Prin definiție, randamentul raportat la electronii disponibili în substrat (randament de dezvoltare) Y_d se calculează cu relația:

$$Y_d = \frac{Y_{X/S}}{Y_{eds}} \text{ [g/echiv. eln. disp.]}, \tag{7}$$

unde: Y_{eds} este numărul echivalenților de electroni disponibili din substrat (Minkevich și Eroshin — 1973);

$$Y_{eds} = \frac{\gamma_S}{M'_S}; \tag{8}$$

M'_S — masa redusă a substratului ;

γ_P — numărul echivalenților de electroni disponibili în substrat.

Pentru deducerea relației de calcul a acestui parametru se pornește de la ecuația oxidării unui substrat organic cu formula redusă $CH_aN_bO_cP_dS_e$ (obținută prin împărțirea coeficienților elementelor la numărul atomilor de carbon din moleculă).

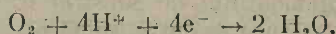


$$CH_aN_bO_cP_dS_e + x\ O_2 \rightarrow CO_2 + y\,H_2O + bNH_3 + dH_3PO_4 + eH_2SO_4$$

$$x = \frac{1}{2}(a - 3b - 3d - 2e);$$

$$x = \frac{1}{4}(4 + a - 3b - 2c + 5d + 6e).$$

Deoarece pentru reducerea unui mol de oxigen sînt necesari 4 echivalenți de electroni :



$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2\ H_2O,$$

numărul echivalenților de electroni necesari pentru combustia unei cantități de substrat ce conține un atom gram de carbon este :

$$\gamma_S = 4 \cdot x.$$

Deci, pentru $CH_aN_bO_cP_dS_e$, gradul de reducere va fi

$$\gamma_S = 4 + a - 3b - 2c + 5d + 6e \qquad (9)$$

adică

$$C = +4 ;\ H = +1 ;\ N = -3 ;\ O = -2 ;\ P = +5 ;\ S = +6.$$

Gradul de reducere al cîtorva substraturi uzuale este prezentat în tabelul 12.

R o e l s (1980) propune corelarea nivelului de reducere cu randamentul de substrat în cazul în care sursa de carbon este și sursă de energie ; sursa de

Tabelul 12

Masele reduse, gradul de reducere și căldurile de combustie corespunzătoare pentru cîteva substraturi
(Birou, 1987)

Substratul	Formula	Formula redusă	γ_s	M'_s	$\Delta H'_s$
Acid citric	$C_6H_8O_7$	$CH_{1.33}O_{1.16}$	3	32,07	326,86
Acid succinic	$C_4H_6O_4$	$CH_{1.5}O$	3,5	29,52	372,75
Glucoză	$C_6H_{12}O_6$	CH_2O	4	30,03	467,17
Lactoză	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$CH_{1.83}O_{0.92}$	4	28,53	470,46
Acid acetic	$C_2H_4O_2$	CH_2O	4	30,02	437,27
Glicerină	$C_3H_8O_3$	$CH_{2.67}$	4,67	30,70	553,68
Etanol	C_2H_6O	$CH_3O_{0.5}$	6	23,04	683,41
Metanol	CH_4O	CH_4O	6	32,04	726,51
Hexadecan	$C_{16}H_{34}$	$CH_{2.125}$	6,13	14,15	669,20
Amoniac	NH_3	—	3	17,03	347,92

azot este amoniacul şi cantitatea produşilor secundari formaţi este neglijabilă :

$$Y'_{X/S} = 0{,}05 + 0{,}12 \cdot \gamma_S \quad \text{pentru } \gamma_S \leqslant 4{,}58 \qquad (10)$$

$$Y'_{X/S} = 0{,}6 \quad \text{pentru } \gamma_S > 4{,}58 \qquad (11)$$

unde :

$$Y'_{X/S} = (1 - A)\frac{M'_S}{M'_C} \cdot Y_{X/S} \qquad (12)$$

M'_S = masa redusă a substratului ;

M'_C = masa redusă a celulelor ;

$Y_{X/S}$, $Y'_{X/S}$ = randamente de substrat ;

A = fracţia de cenuşă din biomasa uscată.

Din relaţiile prezentate anterior se poate observa că pe măsură ce gradul de reducere al substratului se măreşte, creşte şi randamentul de substrat pînă la valoarea $\gamma_S \approx 4{,}6$. Pentru substraturi cu un grad de reducere mai mare, valoarea randamentului de substrat este aproximativ constantă.

Deoarece pentru desfăşurarea procesului este necesară disiparea unei anumite cantităţi de energie, substraturile cu un grad mic de reducere nu conţin suficientă energie pentru a permite fixarea întregii cantităţi de carbon, în biomasă. Creşterea va fi limitată energetic. Pe măsură ce γ_S creşte, se va mări şi randamentul de substrat.

În cazul substraturilor cu un grad de reducere ridicat (metan : $\gamma_S = 8$) există mai multă energie decît poate fi fixată în biomasă şi va trebui disipată. Aceste consideraţii pot explica observaţia că în cazul utilizării metanului sau *n*-alcanilor ca sursă de carbon, se disipează mult mai multă energie decît în cazul utilizării glucozei sau metanolului, deci randamentul de dezvoltare va fi mult mai mic (vezi datele din tabelul 13).

Tabelul 13

Randamente de biomasă pentru creşterea aerobă pe hidorcarburi
(Stouthamer, 1969)

Microorganismul	Hidrocarbură	$Y_{X/S}\left(\frac{g}{mol}\right)$	$Y_d\left(\frac{g}{ech.eln.d}\right)$
C. intermedia	$C_{16}H_{34}$	185,7	1,89
C. intermedia	$C_{17}H_{36}$	174,8	1,68
C. intermedia	$C_{18}H_{38}$	211,5	1,92
C. intermedia	$C_{22}H_{46}$	275,8	2,06
C. intermedia	$C_{28}H_{58}$	326,7	1,92
C. intermedia *C. lipolytica*	$C_{16}H_{34}$	177,3	1,81
C. intermedia *C. lipolytica*	$C_{17}H_{36}$	178	1,71
C. intermedia *C. lipolytica*	$C_{18}H_{38}$	215	1,95
C. intermedia *C. lipolytica*	$C_{22}H_{46}$	278	2,07
C. lipolytica	$C_{15}H_{32}$	190,7	2,07
C. lipolytica	$C_{18}H_{38}$	217,9	1,98
C. tropicalis	$C_{16}H_{34}$	181,8	1,86
C. intermedia *C. lipolytica*	$C_{28}H_{58}$	348	2,05
Torula sp.	$C_{16}H_{34}$	186,4	1,90
			media = 1,92

Exemplu. Care este randamentul de dezvoltare Y_d al drojdiei *S. cerevisiae* pe substrat de glucoză, dacă aceasta conține 8,6% cenușă și are masa redusă egală cu 24,37 ?

Se calculează γ_S pentru glucoză :



$C_6H_{12}O_6 = (CH_2O)_6$

$\gamma_S = 4 + 2 - 2 = 4$;

cum $\gamma_S = 4 < 4{,}58$

$Y'_{X/S} = 0{,}05 + 0{,}12 \cdot 4 = 0{,}53.$

Din (10)

$$Y_{X/S} = \frac{Y'_{X/S}}{(1 - A)} \cdot \frac{M'_C}{M'_S};$$

$$Y_{X/S} \doteq \frac{0{,}53}{(1 - 0{,}086)} \cdot \frac{24{,}37}{30{,}03} = 0{,}47,$$

se determină

$$Y_{eds} = \frac{\gamma_S}{M'_S} = \frac{4}{30{,}03} = 0{,}133;$$

$$Y_d = \frac{0{,}47}{0{,}133} = 3{,}53.$$

Payne (1970) a calculat valoarea medie a randamentului de dezvoltare pentru 79 de microorganisme dintre care 69 crescute pe substrat C_4-C_6, obținînd o valoare medie $Y_d = 3{,}07$.

În cazul utilizării substraturilor cu mase moleculare mai mici (C_1-C_3), această valoare este substanțial diminuată.

Nagai (1979) consideră că această comportare se poate datora următoarelor cauze :

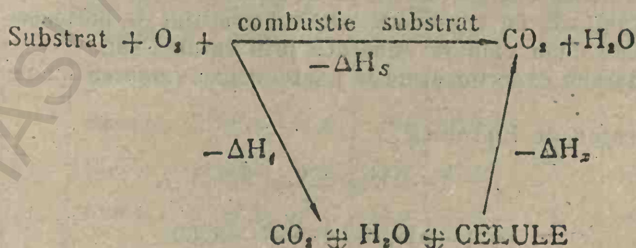
— consumul suplimentar de energie (ATP) necesar introducerii în celulă a substraturilor cu mase moleculare mici (pentru 1 mol de glucoză se consumă 1 mol de ATP, ca și pentru 1 mol de acetat ; în primul caz, pentru introducerea a 180 g glucoză este necesar 1 mol ATP, dar în cel de al doilea, pentru 180 g acetat vor fi necesar 3 moli ATP) ;

— consumul suplimentar de energie, necesar sintezei monomerilor (aminoacizi, monozaharide) utilizați în sinteza macromoleculelor biologice (proteine, pilizaharide).

Randamentul bazat pe energia disipată sub formă de căldură. Prin definiție :

$$Y_\Delta = \frac{Y_{X/S}}{(\Delta H_s - XY_s \cdot \Delta H_x)} \text{ [g/kcal]} \qquad (13)$$

Admițînd că oxidantul predominant este oxigenul, diferența dintre căldura de combustie a substratului și căldura de combustie a celulelor formate este egală cu efectul termic al reacției (se admite implicit că formarea produșilor secundari este neglijabilă) :



Exemplu. Să se calculeze randamentul bazat pe energia disipată sub formă de căldură pentru creşterea unei drojdii pe n-alcani, cunoscînd valorile experimentale $\Delta H_s = 11,4$ kcal/g, $\Delta H_x = 4,7$ kcal/g, cînd randamentul de substrat variază între 1,03 şi 1,25 (g/g).

Inversînd relaţia (13) se obţine :

$$\frac{1}{Y_\Delta} = \frac{11\,400}{Y_{x/s}} - 4\,700 \quad [\text{cal/g}]$$

$Y_{x/s}$ (g/g)	Y_Δ calculat (g/cal)	Y_Δ experimental (g/cal)
1.03	6 400	6 060
1.09	5 830	5 800
1.25	4 400	4 600

Randamentul bazat pe energia disipată a fost propus ca înlocuitor al randamentului raportat la numărul de moli de ATP formaţi, deoarece nu necesită decît cunoaşterea concentraţiei şi compoziţiei celulelor pentru aplicarea bilanţului. Din acest motiv, este foarte util, mai ales în cazul utilizării de substraturi şi culturi mixte (de exemplu la tratarea apelor reziduale).

Deoarece cantitatea de căldură degajată odată cu transferul electronilor la oxigen în procesul de oxidare a unei legături C—H este în medie 26,05 kcal/echivalent de electroni, între Y_a şi Y_Δ există următoarea relaţie :

$$Y_\Delta = \frac{Y_a}{26,05} \ [\text{g/kcal}]. \qquad (14)$$

2.1.1.3. RANDAMENTUL BAZAT PE ENERGIA TOTALĂ DISPONIBILĂ

Considerînd că energia disponibilă a substratului se scindează în două părţi :

— energie încorporată în celule ;

— energie catabolică, degajată sub formă de căldură,

P a y n e (1970) propune următoarea relaţie :

$$Y_{kcal} = \frac{\Delta X}{(-\Delta H_x)\cdot\Delta X + (-\Delta H_c)} \ [\text{g/kcal}]. \qquad (15)$$

Analog cazului anterior, se consideră că energia încorporată în produşii secundari este neglijabilă.

Pentru calculul energiei transformate în căldură, autorul menţionat a propus 2 metode :

— se calculează energia catabolică pe baza consumului de oxigen, ştiind că pentru reducerea unui mol de oxigen sînt necesare 104—124 kcal ;

— se calculează energia eliberată de procesele catabolice pe baza unui bilanţ între căldurile de combustie ale substratului şi biomasei (numitorul relaţiei (13) este chiar căldura generată prin catabolism).

În lipsa datelor experimentale se poate utiliza valoarea medie $(-\Delta H_c) = 5,3$ kcal/g.

Ţinînd seama de faptul că :

$$(-\Delta H_x)\cdot\Delta X = 5,3\cdot Y_{x/s} \qquad (16)$$

$$\text{şi} \quad (-\Delta H_c) = 4\cdot\frac{Y_{x/s}}{Y_{x/o}}\cdot 26,05 \qquad (17)$$

se obține :

$$Y_{kcal} = \frac{Y_{x/o}}{5{,}3\,Y_{x/o} - 104}\ [\mathrm{g/kcal}] \qquad (18)$$

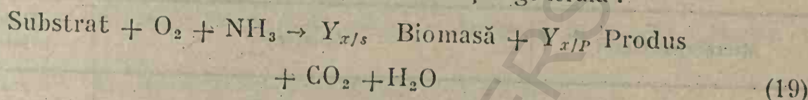
Notă : $Y_{x/s}$ este exprimat în [g/mol] ca și $Y_{x/o}$.

2.1.2. STOICHIOMETRIA BIOPROCESELOR

Stoichiometria studiază relațiile cantitative ce există între participanții la reacțiile chimice (biochimice), cunoscînd compoziția reactanților și produșilor.

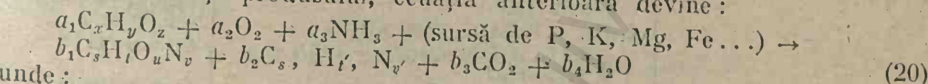
Un bioproces poate fi descris pe baza observării modificărilor macroscopice ce apar datorită dezvoltării culturii, modificări traduse de obicei prin variații de pH, concentrații de substrat, celule, produși.

Utilizînd randamentele, se poate scrie ecuația generală :



$$\text{Substrat} + O_2 + NH_3 \rightarrow Y_{x/s}\ \text{Biomasă} + Y_{x/p}\ \text{Produs} + CO_2 + H_2O \qquad (19)$$

În cazul în care se dispune de analizele chimice elementare ale substratului, biomasei și produsului, ecuația anterioară devine :



$$a_1C_xH_yO_z + a_2O_2 + a_3NH_3 + (\text{sursă de P, K, Mg, Fe}\ldots) \rightarrow b_1C_sH_tO_uN_v + b_2C_{s'}H_{t'}N_{v'} + b_3CO_2 + b_4H_2O \qquad (20)$$

unde :

$C_xH_yO_z$ este formula sursei de carbon ;
$C_sH_tO_uN_v$ — formula biomasei ;
$C_{s'}H_{t'}O_{u'}N_{v'}$ — formula produsului secundar.

Pentru aplicarea ecuației (20) este necesară în primul rînd cunoașterea compoziției chimice a biomasei și a produsului secundar pentru a se putea calcula „formulele“ acestora. Compoziția elementară a cîtorva drojdii este prezentată în tabelul 14. În cazul în care nu sînt disponibile date analitice pentru microorganismul utilizat se poate folosi formula aproximativă :



$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ (Roels, 1983)

Tabelul 14

Compoziția elementară a unor drojdii

Microorganismul	Substratul	Compoziția chimică				% Cenușă	Referință bibliografică
		C	M	N	O		
. cerevisiae	Etanol	45	6,8	9,0	30,6	8,6	Jacques, 1970
. boidinii	Metanol	42,8	7,2	5,45	—	—	Sahm, 1972
andida	*n*-parafină	47,0	7,0	10,0	31,0	5,0	Champagnat, 1974
. utilis ($\mu = 0{,}08\ h^{-1}$)	Glucoză	50,0	7,6	11,1	31,3	—	Herbert, 1976
utilis ($\mu = 0{,}45\ h^{-1}$)	Glucoză	46,9	7,2	10,9	35,0	—	Herbert, 1976
utilis ($\mu = 0{,}06\ h^{-1}$)	Etanol	50,3	7,7	11,0	30,8	—	Herbert, 1976
utilis ($\mu = 0{,}43\ h^{-1}$)	Etanol	47,2	7,3	11,0	34,6	—	Herbert, 1976

După cum se poate observa, în ecuația (20) sînt 6 necunoscute (a_1, a_2, b_1, b_2, b_3, b_4) care de obicei se reduc la 5, deoarece ecuațiile stoechiometrice se scriu pentru 1 mol de substrat ($a_1 = 1$). Pentru ca sistemul să fie determinat vom avea nevoie de 5 ecuații. Patru dintre acestea se obțin făcînd bilanțul celor 4 elemente (C, H, O, N), cea de-a cincea necunoscută putînd fi determinată fie prin analiză chimică (concentrația biomasei/produsului), fie prin calcularea „coeficientului respirator“:

$$RQ = \frac{moli\ CO_2\ formați}{moli\ O_2\ consumați}. \tag{21}$$

Utilizarea ecuațiilor stoechiometrice de forma celor prezentate în tabelul 15 este utilă atît pentru estimarea consumurilor specifice cît și, așa cum se va vedea în cele ce urmează, pentru calcularea efectului termic al reacției, necesarului de oxigen (pentru procesele aerobe) etc.

Tabelul 15

Stoechimetria unor bioprocese

Microorganismul	Ecuația	Referință bibliografică
—	$C_6H_{12}O_6 + 1,5\ O_2 + 0,77\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow 0,90\ C_{4.4}H_{7.3}N_{0.86}O_{1.2} + 2,1\ CO_2 +$ $+ 3,87\ H_2O$	Abbot și Clamen (1973)
—	$C_{16}H_{34} + 12,5\ O_2 + 2,06\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow 2,4\ C_{4.4}H_{7.3}N_{0.86}O_{1.2} + 5,4\ CO_2 +$ $+ 11,34\ H_2O$	Abbott și Clamen (1973)
C. utilis ($D = 0,08\ h^{-1}$)	$0,314\ C_6H_{12}O_6 + 0,75 O_2 + 0,19\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow CH_{1.82}N_{0.19}O_{0.47} + 0,90\ CO_2 +$ $+ 1,18\ H_2O$	Herbet (1976)
C. utilis ($D = 0,06\ h^{-1}$)	$0,865\ C_2H_6O_2 + 1,12\ O_2 + 0,19\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow CH_{1.82}N_{0.19}O_{0.46} + 0,70\ CO_2 +$ $+ 1,60\ H_2O$	Herbet (1976)
C. utilis ($D = 0,45\ h^{-1}$)	$0,283\ C_6H_{12}O_6 + 0,57\ O_2 + 0,20\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow CH_{1.84}N_{0.2}O_{0.56} + 0,66\ CO_2 +$ $+ 1,04\ H_2O$	Herbert (1976)
S. cerevisiae	$C_6H_{12}O_6 + 0,118\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow 0,59\ CH_{1.737}N_{0.200}O_{0.451} +$ $+ 0,432\ C_3H_8O_3 + 1,54\ CO_2 +$ $+ 1,3\ C_2H_5OH + 0,036\ H_2O$ $\Delta G^\circ = -\ 40,06$ Kcal	Battley (1979)
S. cerevisiae	$C_6H_{12}O_6 + 3,918\ O_2 + 0,316\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow 1,929\ CH_{1703}N_{0.171}O_{0.459} + 4,098\ CO_2 +$ $+ 4,813\ H_2O$ $\Delta G^\circ = -\ 471,98$ Kcal	Battley (1979)
S. cerevisiae	$C_2H_5OH + 1,851\ O_2 + 0,153\ NH_3 \rightarrow$ $\rightarrow 1,030\ CH_{1.704}N_{0.1490}O_{0.408} + 0,970\ CO_2$ $+ 0,970\ CO_2 + 2,346\ H_2O$ $\Delta G^\circ = -\ 199,19$ Kcal	Battley (1979)

2.1.3. EFECTUL TERMIC ȘI EFICIENȚA TERMODINAMICĂ A PROCESELOR BIOLOGICE

Reacțiile biologice sînt exoterme, indiferent de microorganismul utilizat, de condițiile de lucru sau de produșii obținuți.

Deși cantitatea de căldură degajată în urma proceselor biologice este mică în comparație cu cea degajată în procesele chimice, nu trebuie neglijată

deoarece materialul biologic (microorganisme, enzime) este foarte sensibil la variațiile de temperatură.

Pentru estimarea căldurii degajate în timpul unui bioproces au fost propuse mai multe metode, unele dintre ele fiind prezentate în secțiunile anterioare.

I) Calculul efectului termic al reacției pe baza oxigenului consumat sau al CO_2 degajat

$$-\Delta H_r = K_1 \cdot Q_{O_2};\qquad (22)$$

$$K_1 = 104 - 124 \text{ kcal/mol } O_2;$$

$$-\Delta H_r = K_2 Q_{CO_2};$$

$$K_2 = 97 \pm 4 \text{ kcal/mol } CO_2.$$

unde :

$-\Delta H_r$ este efectul termic al reacției (kcal) ;
Q_{O_2} — numărul de moli de oxigen consumați în reacție (identic cu a_2) ;
Q_{CO_2} — nr. de moli de CO_2 degajat (identic cu b_3).

II) Calculul efectului termic pe baza căldurilor de combustie ale substratului și produșilor

$$-\Delta H_r = (-\Delta H_s)(-\Delta S) - (-\Delta H_x)\cdot \Delta X - (-\Delta HP_j)(\Delta P_j) \qquad (24)$$

unde :

$-\Delta H_r$ este efectul termic al reacției (kcal) ;
$-\Delta H_s$ — entalpia de combustie a substratului (kcal/mol) ;
$-\Delta H_x$ — entalpia de combustie a celulelor (kcal/mol) ;
$-\Delta HP_j$ — entalpia de combustie a produsului „J" (kcal/mol) ;
ΔX — cantitatea de biomasă formată (moli) ;
$-\Delta S$ — cantitatea de substrat consumat (moli) ;
ΔP_j — cantitatea de produs „j" format (moli).

• *Determinarea căldurilor de combustie ale substratului se poate face prin mai multe metode :*

— utilizarea tabelelor de date termochimice pentru compușii chimic definiți ;
— în cazul în care nu se dispune de date tabelate și se cunoaște compoziția procentuală a substratului, produșilor și celulelor, pentru oricare din speciile menționate se poate aplica o formulă empirică derivată din cea propusă de Dulong pentru calculul puterii calorice a cărbunilor ;

$$-\Delta H_x = 8{,}07\cdot C + 34{,}43\left(H - \frac{O}{8}\right) \text{ kcal/g} \qquad (25)$$

unde :

C, H, O reprezintă fracția masică de carbon, hidrogen și oxigen din moleculă.

Prin analogie cu relaţia (37) se poate scrie :

$$\xi = \frac{\sigma_p \gamma_p}{\sigma_s \gamma_s} Y_{P/S}. \qquad (38)$$

Din relaţiile de definiţie pentru η şi ξ este evident că nici una dintre ele nu poate depăşi valoarea 1. În acest caz se pot defini randamentele maxim posibile pentru obţinerea biomasei (în absenţa formării produsului) şi produsului (în ipoteza formării unei cantităţi neglijabile de biomasă) :

$$Y_{X/S}^{max} = \frac{\sigma_s \gamma_s}{\sigma_b \gamma_b}; \qquad (39)$$

$$Y_{P/S}^{max} = \frac{\sigma_s \gamma_s}{\sigma_p \gamma_p}. \qquad (40)$$

Din ecuaţia (39) se observă că mărirea gradului de reducere al substratului (care determină de obicei şi creşterea fracţiei masice de carbon) are efecte pozitive asupra randamentului.

Printr-un raţionament asemănător se poate deduce relaţia dintre randamentul raportat la oxigenul consumat şi fracţia de electroni transferată la oxigen (proporţional cu căldura degajată în timpul procesului)

$$Y'_{X/O} = \frac{\text{g biomasă formată}}{\text{g oxigen consumat}}; \qquad (41)$$

$$Y'_{X/O} = \frac{M'_s Y_{X/S}}{32b}. \qquad (42)$$

Cum $M'_s = \frac{12}{\sigma_s}$ se va obţine :

$$Y'_{X/O} = \frac{3}{8b\sigma_s} \cdot Y_{X/S}. \qquad (43)$$

Înlocuind $b = \frac{\varepsilon \gamma_s}{4}$ în ecuaţia (43) :

$$Y'_{X/O} = \frac{3}{2} \frac{1}{\sigma_s \gamma_s \varepsilon} Y_{X/S}. \qquad (44)$$

Cu valoarea lui $Y_{X/S}$ din ecuaţia (37), ecuaţia (44) devine

$$Y'_{X/O} = \frac{3}{2} \cdot \frac{\eta}{\sigma_b \gamma_b \varepsilon}; \qquad (45)$$

sau

$$Y'_{X/O} = \frac{3}{2} \cdot \frac{\eta}{(1 - \xi - \eta)} \cdot \frac{1}{\sigma_b \gamma_b}. \qquad (46)$$

2.2. CREŞTEREA MICROORGANISMELOR

2.2.1. CICLUL DE CREŞTERE

În mod obişnuit fenomenul de creştere în sens biologic a fost definit ca o simplă adăugare de substanţă nouă la o celulă sau la un microorganism (Donachie şi Begg, 1970). Creşterea microorganismelor este însă un fenomen complex, reprezentînd o însumare a proceselor metabolice din celulă.

Din alt punct de vedere, creşterea este rezultatul interacţiunilor dintre elulă şi mediu, nivel la care se pot aplica legile termodinamicii, ale transferului de masă şi de energie. În consecinţă, presiunea, temperatura, concenraţia nutrienţilor şi a diverşilor produşi rezultaţi, precum şi aprovizionarea ontinuă a celulei cu energia necesară în reacţiile de biosinteză, vor influenţa reşterea.

Măsurarea dezvoltării unei culturi microbiene se poate face, în prinipiu, în două moduri (Luedeking, 1967) :

— se determină creşterea, înţelegînd prin aceasta sporirea masei culurii ;

— se determină multiplicarea, adică mărirea numărului de celule (a iivelului populaţiei).

Pentru toate microorganismele unicelulare, creşterea se poate caraceriza prin cîteva etape : mărirea dimensiunilor celulei, diviziunea celulei şi epararea de celula mamă (Slater, 1984). Această prezentare se aplică atît a fisiunea binară (bacterii), cît şi la mecanismele de înmulţire prin înmuurire (drojdii). Acest mod de definire prezintă şi avantajul cuprinderii elor 2 aspecte : creşterea (în biomasă) şi multiplicarea (sporirea numărului le indivizi).

Pentru a aprecia dinamica multiplicării, se poate utiliza un sistem de ultivare închis (discontinuu) în care creşterea este limitată la un volum ix de mediu, a cărui compoziţie se modifică în timp, atît datorită epuizării iutrienţilor, cît şi adăugării produşilor de metabolism.

Reprezentarea grafică a concentraţiei celulare (exprimată ca număr le celule, densitate optică sau substanţă uscată), în timp descrie fazele cilului de creştere a microorganismelor (Monod, 1949). Procesul evoluează în şapte faze succesive, în funcţie de viteza specifică de creştere (Blakebrough, 1967, fig. 5).

Limitele fazelor ciclului de creştere sînt considerate de obicei în punctele în care se modifică panta curbei de creştere. Deoarece viteza de creştere şi cea de multiplicare pot fi aproximate una prin alta doar pentru o scurtă perioadă de timp din faza exponenţială, ele coincizînd (aproximativ) doar dacă mărimea medie a celulelor rămîne constantă, delimitarea fazelor de creştere va depinde de metoda utilizată pentru caracterizarea dinamicii populaţiei.

Faza de latenţă. Numită şi faza de inducţie sau faza de lag, începe în momentul transferului celulelor în mediu (inoculare sau însămînţare) şi ia sfîrşit în momentul în care acestea încep să se multiplice. În această perioadă populaţia microbiană rămîne constantă.

Durata fazei de lag exprimă întîrzierea creşterii reale faţă de creşterea teoretică în absenţa latenţei (Zarnea, 1984). Ea poate varia de la cîteva minute la cîteva ore.

Faza creşterii accelerate. A fost descrisă ca o perioadă în care reacţiile care alcătuiesc metabolismul celular îşi măresc continuu viteza de desfăşurare, tinzînd către viteza maximă ce va fi atinsă în faza exponenţială.

În urma cercetărilor întreprinse (Winslow şi Walker 1939, Hinselwood 1946, Monod 1949) s-au desprins următoarele concluzii :

a) În timpul fazei de lag viteza de creştere este mai mare decît viteza de multiplicare şi, drept urmare, dimensiunile celulelor sînt mai mari decît oricare altă fază a ciclului de creştere. Pe de altă parte, activitatea enzimatică, exprimată prin volumul de oxigen consumat sau volumul de dioxid de carbon degajat raportat la substanţa uscată totală, este aceeaşi în faza

Din aceste motive, modelele propuse pentru determinarea cinetică a proceselor de interacțiune între celule și mediul în care acestea se află conțin, de regulă, așa-numitele ecuații de bază ale creșterii microorganismelor.

Aceste ecuații au fost deduse considerînd procesele ce iau naștere în timpul creșterii microorganismele în condiții ideale în care toți nutrienții necesari pentru o creștere echilibrată sînt prezenți în exces.

Slater (1984) consideră că pentru scopuri conceptuale deducerea ecuațiilor de baza ale creșterii microorganismelor se poate face în ipoteza că acestea se înmulțesc printr-un proces de fisiune binară. Aceasta înseamnă că celula crește în mărime pînă la un punct, după care celula parentală se scindează în două celule-fiice identice (Zarnea, 1984).

Deci, ecuațiile de bază ale creșterii se pot aplica și pentru microorganisme la care creșterea nu decurge prin mecanismele fisiunii binare, cum este cazul creșterii drojdiilor (înmugurire).

Așadar, în condiții ideale (nutrienți disponibili în exces), calea pe care o urmează dezvoltarea unei populații va fi aceeași, indiferent de modul de organizare și de structura organismului.

În toate cazurile, analiza cinetică a procesului va presupune că se mențin condițiile ideale și deci că produși de metabolism nu vor modifica condițiile fizico-chimice predominante ale mediului înconjurător.

În orice moment s-ar face, analiza unei populații în creștere va dezvălui că, în medie, toate celulele vor consuma nutrienții disponibili, vor produce biomasă și vor crește în mărime exact cu aceeași viteză. Examinarea unei singure celule din întregul populației va arăta că după o perioadă de timp echivalentă cu cea necesară pentru ca celula să crească în mărime exact de două ori, ea se va divide pentru a produce două celule-fiice. Acestea vor avea aceeași compoziție una față de cealaltă și față de celula-mamă. Dacă în continuare condițiile de mediu se mențin favorabile, ambele celule-fiice vor repeta procesul de creștere și diviziune, fiecare generînd alte două noi celule.

Pentru toate microorganismele unicelulare, creșterea se poate caracteriza prin mărirea dimensiunilor celulei, dividerea celulei și separarea de celula parentală. Această caracterizare se aplică și la fisiunea binară și la mecanismele tip înmugurire. Tot din acest mod de definire reiese că creșterea populației este dată de o creștere a numărului de celule (pe unitate de volum de populație) și de o creștere în biomasă (pe unitate de volum de populație).

Pe această bază, Slater (1984) propune două căi diferite, dar în mod evident înrudite, de deducere a ecuațiilor de bază ale creșterii.

2.2.2.1. DEDUCEREA ECUAȚIEI DE CREȘTERE PE BAZA SPORIRII NUMĂRULUI DE CELULE

Procesul de creștere ciclică descris anterior și repetat pentru fiecare generație este prezentat în tabelul 16 (Slater, 1984).

Prin definiție, timpul scurs între generația $(n - 1)$ și generația (n) este constant dacă se păstrează stabile condițiile de mediu. De asemenea, viteza de sporire a numărului de celule din populație crește în timp. Concret, viteza de creștere este guvernată de doi factori majori. În primul rînd, viteza este controlată de natura intrinsecă a organismului, adică potențialul și structura sa genetică de bază, care îi determină caracteristicile fiziologice. În al doilea rînd, viteza de creștere a populației poate fi substanțial modificată de factori extrinseci, datorați mediului înconjurător al microorganismului (vezi subcapitolul 2.3).

Tabelul 16

Procesul de creştere ciclică
(Slater, 1984)

Caracteristici	Numărul de cicluri celulare complete sau numărul de generaţii						
	1	2	4	8	16	32	64 . . . a
Numărul de celule individuale din populaţie la începutul fiecărei generaţii	x $2^0 \cdot x$	$2x$ $2^1 \cdot x$	$4x$ $2^2 \cdot x$	$8x$ $2^3 \cdot x$	$16x$ $2^4 \cdot x$	$32x$ $2^5 \cdot x$	$64n \ldots x$ $2^6 \cdot x \ldots 2^n \cdot x$
Mărimea populaţiei cînd $x = 1 \cdot 10^6$ organisme	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$16 \cdot 10^6$	$32 \cdot 10^6$	$64 \cdot 10^6 a \cdot 10^6$
Viteza de creştere a numărului de celule pe generaţie	—	x	$2x$	$4x$	$8x$	$16x$	$32x \ldots (a - b)x$
Factorul de multiplicare pe generaţie	2	2	2	2	2	2	2 . . . 2

Notă : x = mărimea populaţiei iniţiale ;
n = a n-a generaţie ;
a = constantă de multiplicare la a n-a generaţie.

Deci viteza de creştere a numărului de celule în timp este variabilă, fiind impusă de tipul de organism şi de natura mediului din jurul celulei. Pentru un anumit organism şi în condiţii de mediu constante, timpul de dublare a mărimii unei populaţii este o constantă caracteristică, cunoscută sub numele de timp de dublare, t_d (unităţi de măsură : timp). În mod teoretic, timpul de dublare are trebui să fie acelaşi cu timpul de generare pentru o singură celulă (creştere şi dividere în două celule-fiice). Dar, datorită faptului că diviziunea celulei nu este legată foarte strict de mărimea ei, putînd să rezulte două celule-fiice care să nu aibă exact aceeaşi mărime, se poate vorbi de o distribuţie a timpilor de generare. Teoretic se poate calcula un timp de generare mediu, care este echivalent cu timpul de dublare. În practică, este însă mult mai simplă determinarea unei proprietăţi macroscopice a populaţiei, cum este numărul de celule pe unitatea de volum. Variaţia acestui parametru în timp descrie dezvoltarea culturii.

Din datele cuprinse în tabelul 16 se vede că factorul de multiplicare între generaţii este constant şi deci mărimea populaţiei din generaţia (n) depinde de cea a populaţiei din generaţia $(n-1)$. Sau, altfel spus, mărimea populaţiei după un anumit timp de creştere, x_t, depinde de mărimea populaţiei iniţiale, x_0, şi de timpul de creştere, t. Se poate scrie :

$$x_t = x_0 2^n ; \tag{47}$$

dar $$n = t/t_d$$

deci $$x_t = x_0 2^{t/t_d}. \tag{48}$$

Ecuaţia (48) are forma generală a unei ecuaţii exponenţiale şi caracterizează modul de creştere al unei populaţii microbiene în condiţii optime. În practică se foloseşte mai mult forma logaritmată a ecuaţiei (48) :

$$\ln x_t = \ln x_0 + \frac{t}{t_d} \ln 2. \tag{49}$$

2.2.2.2. DEDUCEREA ECUAŢIEI DE CREŞTERE PE BAZA SPORIRII POPULAŢIEI ÎNTR-UN INTERVAL DE CREŞTERE MIC

Într-o populaţie eterogenă există un amestec de celule aflate în diferite faze ale ciclului lor şi avînd timpi de generare individuali variaţi. La un moment dat, o fracţie din această populaţie se află în faza de diviziune celulară şi deci determină o creştere în mărime a populaţiei.

Se consideră că la momentul $t = 0$, mărimea populaţiei iniţiale este x_0 După un interval mic de timp Δt, creşterea mărimii populaţiei va fi Δx Raportul $\Delta x/\Delta t$ depinde de valoarea lui x_0 :

$$\frac{\Delta x}{\Delta t} \approx x_0. \tag{50}$$

Trecînd la limită în ecuaţia (50) $(t \to 0)$ se va obţine :

$$\lim_{t\to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{dx}{dt} = \mu x_0, \tag{51}$$

unde : μ este o constantă de proporţionalitate, cunoscută sub numele de viteză specifică de creştere (unităţi : timp^{-1}).

Constanta μ, definită prin ecuația (51), are o semnificație biologică precisă și este o măsură a numărului de indivizi noi generați de un anumit număr de indivizi existenți, într-o perioadă fixă de timp de creștere. Din aceleași motive expuse pentru t_d, și valoarea lui μ depinde de microorganismul folosit și de condițiile de mediu. În condiții optime de mediu (nerestrictive) pentru un anumit organism, se obține valoarea maximă a lui μ. În aceste condiții putem vorbi de viteza specifică maximă de creștere, μ_{max}.

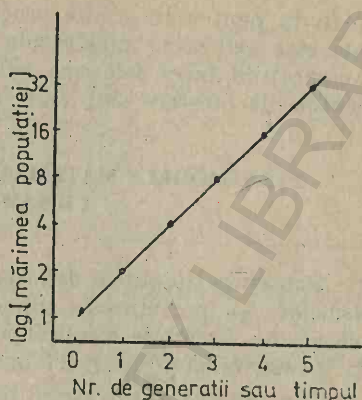


Fig. 7. Reprezentarea grafică a ecuației (52).

Se integrează ecuația (51) între următoarele limite:

$$t = 0 \qquad x = x_0$$

$$t = t \qquad x = x_t$$

și se obține soluția:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t, \tag{52}$$

sau

$$x_t = x_0 e^{\mu t}. \tag{53}$$

Reprezentarea grafică a ecuației (52) este similară cu cea a ecuației (49) (fig. 7).

Prin compararea ecuațiilor 49 și 52 se obține

$$\mu = \frac{0{,}693}{t_d} = \frac{\ln 2}{t_d}. \tag{54}$$

Din matematică se știe că panta unei drepte este egală cu tangenta unghiului format de dreaptă cu o paralelă la axa O_X dusă printr-un punct al ei.

$$\mu = \frac{\ln x_j - \ln x_i}{t_j - t_i} = \operatorname{tg} \alpha \tag{55}$$

unde: x_j și x_i sînt mărimile populației la momentele t_j și respectiv t_i; $t_j > t_i$.

Ecuațiile de creștere prezentate au fost obținute considerînd populațiile formate din celule individuale, iar viteza de creștere exprimată prin sporirea numărului de celule din populație) (Slater, 1984). Dar există și alte moduri de exprimare a mărimii populației: numărul total de celule față de numărul de celule viabile, greutatea biomasei, conținutul de ATP, de lipopolizaharide sau de acizi nucleici. Deci x poate fi orice parametru, a cărui valoare este proporțională cu mărimea populației. Unii parametri, cum sînt conținutul de ARN sau de proteină, pot varia semnificativ în diferite condiții, iar aceste variații pot să nu se reflecte în valoarea vitezei de creștere. În practică, este preferabil să folosim pentru exprimarea lui x, acel parametru care să reflecte compoziția completă a celulei. De obicei, acesta este biomasa, exprimată în grame de substanță uscată pe unitatea de volum. Această alegere este

potrivită pentru că şi alte procese implicate în creşterea microorganismelor, cum este utilizarea substratului, folosesc unităţi echivalente. În acest mod, comparaţiile între folosirea substratului, producerea de biomasă şi randamentele de creştere sînt mult mai uşor de înţeles.

2.2.2.3. MODELE MATEMATICE PENTRU CREŞTEREA MICROBIANA CU LIMITARE DE NUTRIENŢI

Pentru a simplifica deducerea ecuaţiilor de bază ale creşterii microorganismelor, s-a presupus că toţi nutrienţii necesari sînt prezenţi în cantităţi nelimitate. Astfel de condiţii pot exista doar pentru perioade scurte de timp (la începutul unei cultivări în şarjă de exemplu).

Consumarea substratului limitativ impune restricţii asupra mărimii finale a populaţiei, iar cei doi parametri sînt proporţionali unul cu altul:

$$x_f \approx S_0, \tag{56}$$

unde: S_0 este concentraţia iniţială a substratului limitativ;
x_f = mărimea populaţiei finale.

Deci: $x_f = Y_{x/s} S_0$ (57)

unde:

$Y_{x/s}$ este constantă de proporţionalitate, numită randament de creştere observat.

Ţinînd seama şi de mărimea populaţiei iniţiale, x_0, precum şi de concentraţia finală a substratului limitativ, S, ecuaţia (57) devine:

$$Y_{x/s}(S_0 - S) = x_f - x_0. \tag{58}$$

Cel mai simplu, $Y_{x/s}$ se poate defini ca greutatea biomasei produse de unitatea de substrat limitativ. În cazul în care x_f se exprimă în grame de biomasă pe litru, $Y_{x/s}$ va avea ca unităţi de măsură grame de biomasă produsă pe gram de substrat utilizat (vezi subcap. 2.1.1.1).

Termenul de randament se referă, de fapt, la cît de mult din substratul disponibil este utilizat pentru producerea de biomasă, faţă de cantitatea folosită pentru generarea de energie necesară în reacţiile de biosinteză.

S-au propus multe moduri de exprimare a randamentului de creştere observat pentru a găsi o bază adecvată pentru compararea diferitelor organisme, substraturi şi condiţii de cultivare (vezi subcapitolul 2.1).

M o n o d (1949) este primul care a stabilit o relaţie între concentraţia substratului limitativ şi viteza specifică de creştere. El a adoptat ecuaţia Michaelis-Menten din cinetica enzimatică la creşterea microorganismelor.

Relaţia dedusă de Monod (fig. 8) este:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \tag{59}$$

în care: S este concentraţia substratului limitativ, (g/l)
μ — viteza specifică de creştere; (h^{-1})
μ_{max} — maximul vitezei specifice de creştere; (h^{-1})
K_s — constanta de saturare care este echivalentă cu valoarea lui S la care viteza de creştere este egală cu $\mu_{max}/2$. (g/l)

Constanta de saturare este o măsură a afinității organismului pentru substratul limitativ; o valoare mai mică a lui K_s înseamnă o afinitate mai mare pentru substratul limitativ și deci o capacitate mai mare de a crește rapid la concentrații scăzute de substrat limitativ.

Din reprezentarea grafică $\mu = f(S)$ (fig. 8) se observă că:

— la concentrații mari de substrat ($S \gg K_s$), ecuația (59) devine:

$$\mu = \mu_{max}, \qquad (60\ a)$$

descriind o cinetică de ordin zero;

— la concentrații mici de substrat ($S \ll K_s$), ecuația (59) se transformă în:

$$\mu = \mu_{max}\frac{S}{K_s}, \qquad (60\ b)$$

relație care descrie o cinetică de ordinul 1.

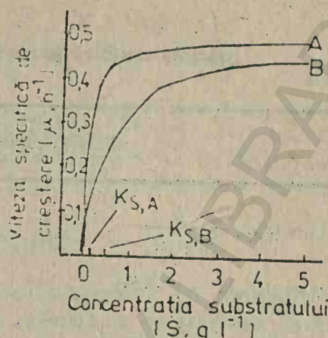


Fig. 8. Reprezentarea grafică a ecuației Monod: curba A: $\mu_{max} = 0{,}5$ (h^{-1}); $K_s = 0{,}1$ (g/l); curba B: $\mu_{max} = 0{,}5$ (h^{-1}); $K_s = 0{,}5$ (g/l) (Slater, 1979).

Din ecuațiile (57) și (58) reiese că într-un interval mic de timp, Δt, populația va crește în mărime cu o cantitate mică, Δx, ca o consecință a utilizării unei mici cantități de substrat limitativ, $-\Delta S$. Deci:

$$-\frac{\Delta x}{\Delta S} = Y_{x/s}; \qquad (61\ a)$$

$$\lim_{s \to 0}\left(-\frac{\Delta x}{\Delta S}\right) = -\frac{dx}{dS} = Y_{x/s}. \qquad (61\ b)$$

Înlocuind pe dx din ecuația (51) în ecuația (61 b) se obține (după rearanjare):

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}}. \qquad (62)$$

Semnul „—" indică o scădere a concentrației substratului în timp. Constantele μ și $Y_{x/s}$ pot fi înlocuite printr-o altă constantă, q, viteza specifică metabolică, sau coeficient metabolic, obținînd:

$$-\frac{dS}{dt} = qx. \qquad (63)$$

Viteza specifică metabolică se definește ca viteza de consum a substratului limitativ de unitatea de biomasă în unitatea de timp (unități de măsură; grame de substrat limitativ pe gram de biomasă și pe oră).

Cei doi parametri de bază implicați în creșterea populației microbiene, sporirea numărului de celule sau a concentrației de biomasă și scăderea concentrației substratului limitativ de creștere, pot fi modelați în multe moduri (tabelul 17).

Tabelul 11

Modele cinetice pentru creșterea microbiană cu limitare de substrat (Moser, 1985)

Modelul cinetic	Referință
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}$	Monod (1942)
$\mu = \mu_{max}(1 - e^{-S/k_s})$	Teissier (1936)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + k_s \cdot x}$	Contois (1959)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_s + K_s) + s}$	Powell (1967)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{2k}$, pentru $S < 2k$	
$\mu = \mu_{max}$, pentru $S > 2k$	Blackmann (1905)
$v_{Rx} = \mu \Phi x$	Kono și Asai (1969)

2.2.2.4. ECUAȚIA LOGISTICĂ

Studiile întreprinse asupra dinamicii creșterii populațiilor au scos în evidență ecuația empirică care descrie sporirea unei populații:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \times \left(1 - \frac{x}{x_f}\right). \tag{64}$$

Variabilele μ_{max}, x și x_f sînt cele definite anterior. Această ecuație descrie variația densității populației din momentul în care începe creșterea (începutul fazei exponențiale). La începutul ciclului de creștere în sistem discontinuu, atunci cînd concentrația biomasei este mică, x/x_f are o valoare mică, iar termenul $[1 - (x/x_f)]$ tinde către valoarea unu și deci ecuația (64) se va reduce la ecuația (51). Atunci cînd x crește, x/x_f va tinde către unu, iar termenul $[1 - (x/x_f)]$ va avea o valoare mult mai mică decît unu. Acest termen va avea o acțiune restrictivă asupra vitezei de creștere. În momentul în care populația atinge nivelul maxim, $x = x_f$ și $[1 - (x/x_f)] = 0$ și deci $dx/dt = 0$, ceea ce reprezintă o caracteristică a fazei în care populația atinge nivelul maxim. Acest model descrie creșterea populației, dar nu ține seama decît de un factor, x_f, care limitează creșterea. Pentru că nu identifică și alte variabile cu valoare limitativă, se consideră că modelul logistic este în mare măsură empiric.

Pentru a determina viteza de creștere la o anumită densitate a populației se poate folosi ecuația:

$$\mu = \mu_{max}\left(1 - \frac{x}{x_f}\right). \tag{65}$$

Înlocuind această expresie a lui μ în ecuaţia (12) se obţine:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{\mu_{max}[1 - (x/x_f)]}{Y_{x/s}} x. \quad (66)$$

Printr-un calcul iterativ şi folosind ecuaţiile (64) şi (66) se poate calcula creşterea în populaţie sau concentraţia de biomasă precum şi scăderea asociată a concentraţiei subtratului limitativ.

2.2.2.5. MODELUL DE SATURARE

Se poate descrie ciclul de creştere a microorganismelor şi cu ajutorul nui model bazat pe ecuaţia M o n o d. Pentru aceasta se substituie expresia lui μ din ecuaţia (59), obţinîndu-se următoarea relaţie:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} S \cdot x}{(K_s + S)}. \quad (67)$$

Pentru primele faze ale creşterii, cînd $S \gg K_s$, raportul $S/(K_s + S)$ nde spre valoarea 1 şi ecuaţia (67) se reduce la ecuaţia de bază pentru ceşterea exponenţială, în condiţii nerestrictive,

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \cdot x. \quad (67\ a)$$

Atunci cînd S tinde către valoarea lui K_s, raportul $S/(K_s + S)$ devine foarte mic, ceea ce limitează viteza de variaţie a biomasei în timp $\left(\frac{dx}{dt} \to 0,\right.$ faza staţionară$\left.\right)$.

În fig. *9* şi *10* au fost reprezentate influenţa variaţiei valorilor lui μ_{max} şi K_s asupra dinamicii creşterii microbiene.

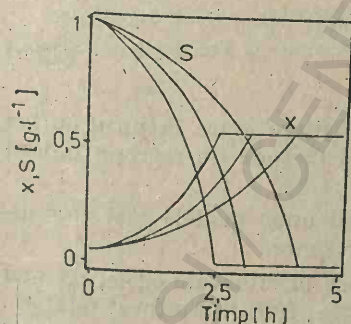


Fig. 9. Influenţa lui μ_{max} asupra concentraţiilor de biomasă şi substrat:
$\mu_{max} = 0{,}6$; $0{,}8$; 1 (h^{-1});
$S_0 = 1$ (g/l); $X_0 = 0{,}05$ (g/l);
$Y_{x/s} = 0{,}5$;
$K_s = 0{,}01$ (g/l);
(Moser, 1985).

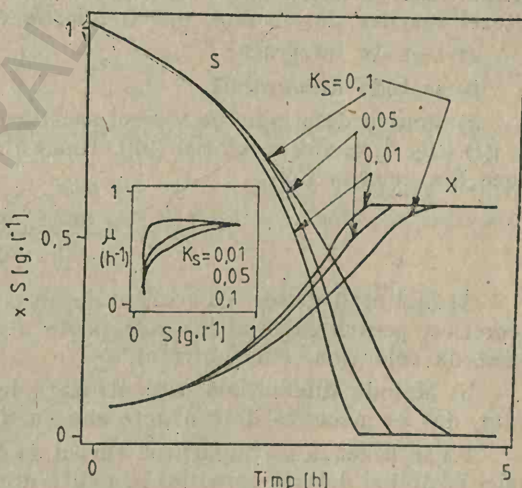


Fig. 10. Influenţa valorii constantei de saturaţie asupra concentraţiilor de biomasă şi substrat (Moser' 1985).

Un parametru important în studiul creșterii microbiene este S_{max}, valoarea concentrației substratului la care viteza are valoarea maximă.

În relația (51) vom nota viteza procesului biologic prin analogie cu viteza reacțiilor chimice, cu v_{Rx}:

$$v_{R,x} = \frac{dx}{dt} = \mu x, \tag{68}$$

și, înlocuind în ecuația (67) valoarea lui x_f din ecuația (58), se obține:

$$\frac{dx}{dt} = v_{R,x} = \mu_{max} \frac{S[x_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)]}{S + K_s}. \tag{69}$$

Derivînd în raport cu S se obține:

$$\frac{\partial v_{Rx}}{\partial S} = -\frac{\mu_{max} Y_{x/s} \cdot S^2 + 2Y_{x/s} K_s \cdot S - K_s(x_0 + Y_{x/s} \cdot S_0)}{(K_s + S)^2}.$$

Prin anularea primei derivate se obține un punct de extrem (în acest caz un punct de maxim), S_{max}:

$$S_{max}^2 + 2K_s \cdot S_{max} - K_s\left(S_0 + \frac{x_0}{Y_{x/s}}\right) = 0.$$

Rezolvînd această ecuație de gradul doi în S, rezultă valoarea lui S_{max}:

$$S_{max} = \sqrt{K_s^2 + K_s(S_0 + x_0/Y_{x/s})} - K_s. \tag{70}$$

Cunoscînd valorile parametrilor implicați, se poate determina, de exemplu, momentul optim de trecere de la cultivarea discontinuă la cea continuă.

Pentru aplicarea în practică a modelului Monod este necesară, în primul rînd, determinarea parametrilor cinetici μ și K_s. Pentru determinarea vitezei specifce de creștere, pot fi folosite două tipuri de metode:

a) metoda integrată;

b) metoda diferențială.

a) Pentru determinarea vitezei specifice de creștere se reprezintă $\ln x = f(t)$ (fig. 7) conform relației (52). Relația numerică de calcul a lui μ se deduce din ecuația (52):

$$\mu = \frac{\ln x_f - \ln x_0}{(t_f - t_0)} \tag{52 b}$$

Atunci cînd datele experimentale au o împrăștiere mare în jurul curbei teoretice, pentru calculul lui μ se poate utiliza o metodă de regresie liniară (metoda celor mai mici pătrate).

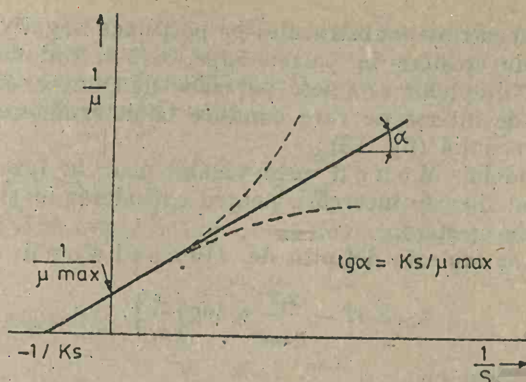
b) Metoda diferențială este utilizată în cazul unor modele mai complicate, dar ea necesită date exacte sau în număr mare.

Ea se bazează pe împărțirea curbei de creștere în intervale egale, cît mai mici posibil și determinarea lui μ, panta dreptei $x = f(t)$, cu ajutorul relației:

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{\Delta x}{\Delta t}. \tag{52 c}$$

Prin prelucrarea relației Monod (59) sub forma:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{S\mu_{max}}, \tag{71}$$



Fii. 11. Metoda de liniarizare Lineweaver-Burk:
$\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{s}\right)$ conform ecuației (71).

se obține așa-numita linearizare Lineweaver-Burk (1934), care oferă posibilitatea determinării simultane atît a valorii lui μ_{max}, cît și a valorii lui K_s (fig. 11).

Deși este o metodă destul de utilizată, prezintă marele dezavantaj al unor abateri mari la concentrații mici de substrat, așa cum se observă din fig. 11, unde cu linie punctată s-a delimitat domeniul cu un nivel de încredere de 95%.

O metodă de liniarizare care prezintă deviații mai mici, și în consecință este superioară reprezentării Lineeweaver-Burk, este cea propusă de Langmuir (1918). Aceasta se bazează pe transformarea ecuației (59) în forma:

$$\frac{S}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} + \frac{S}{\mu_{max}}. \tag{72}$$

În fig. 12 este reprezentată grafic această relație și intervalul de încredere de 95%.

O metodă complet diferită, propusă de Eisenthal (1974), pentru cinetica enzimatică și care se recomandă prin simplitate, constă în reprezen-

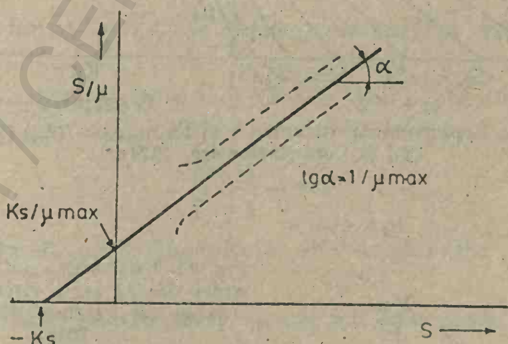


Fig. 12. Liniarizarea ecuației Monod conform metodei Langmuir (1918).

tarea valorilor concentrației substratului pe porțiunea negativă a abscisei și a valorilor vitezei de creștere în partea superioară a ordonatei.

Prin trasarea dreptelor ce unesc perechile de puncte experimentale se obține un punct de intersecție care conduce la determinarea grafică a valorilor μ_{max} și K_s ecuația (fig. 13):

Deoarece, modelul M o n o d este valabil doar în faza creșterii exponențiale, s-au făcut diverse încercări, pentru extinderea lui și pentru celelalte faze ale ciclului de creștere.

Durata *fazei de lag* este definită de H i n s e l w o o d (1944) ca fiind:

$$t_L = rt - \frac{2,3}{\mu_{max}} \times \log\left(\frac{x}{x_0}\right), \tag{73}$$

ceea ce este echivalent cu:

$$t_L = t - \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left(\frac{x}{x_0}\right). \tag{74}$$

Prin *timpul de lag* în concepția lui H i n s e l w o o d se înțelege timpul scurs de la inoculare pînă în momentul începerii fazei exponențiale (adică, primele două faze ale ciclului de creștere, așa cum s-au definit în subcapitolul 2.1).

Utilizînd *timpul de lag* drept parametru, B e r g t e r și K n o r r e (1972) au obținut următorul model:

$$\mu(S, T) = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} (1 - e^{-t/t_L}). \tag{75}$$

În figura 14 se ilustrează posibilitatea de deducere a lui μ_{max} și t_L; conform modelului propus de Hinselwood.

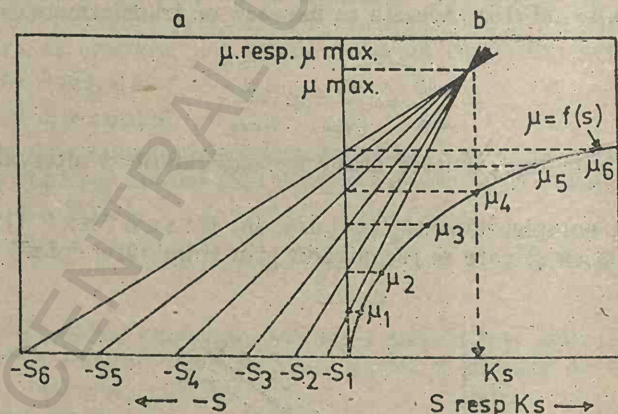


Fig. 13. Reprezentarea directă $\mu = f(s)$ și $\mu_{max} = f(K_s)$ (Eisenthal și Cornish-Bowden, 1974).

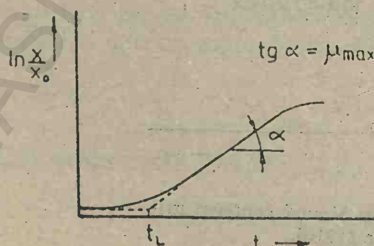


Fig. 14. Estimarea grafică a perioadei de *lag* și a vitezei specifice maxime de creștere (Hinshelwood, 1946).

În procesele de durată mai lungă, o parte din celule mor. Admițînd că numărul de celule care mor este proporțional cu numărul de celule viabile, se poate defini viteza specifică de moarte a celulelor similar cu viteza specifică de creștere, prin ecuația :

$$\mu_m = -\frac{1}{x}\frac{dx}{dt}. \tag{76}$$

În acest caz, viteza specifică aparentă de creștere, μ_a, este dată de relația :

$$\mu_a = \mu - \mu_m, \tag{77}$$

iar concentrația celulară :

$$x = x_0 e^{(\mu - \mu_m)t}. \tag{78}$$

2.2.2.6. MODELE MATEMATICE ALE METABOLISMULUI DE ÎNTREȚINERE ȘI ENDOGEN

Cercetările experimentale au arătat că presupunerea existenței unui randament de substrat independent de timp, de concentrațiile participanților la reacție, de viteza de creștere, este de multe ori doar aproximativă.

Din punct de vedere termodinamic, sistemele cu un înalt grad de organizare (cum sînt microorganismele) se pot menține doar prin disipare de energie. De aceea, existența unei surse de energie este necesară nu numai pentru creștere dar și pentru așa-zisa „menținere" (Pirt, 1965).

Pirt (1975) presupune că o parte din sursa de energie consumată (ΔS) este folosită pentru creștere (ΔSc), iar cealaltă pentru menținere (ΔS_m) :

$$\Delta S = \Delta S_c + \Delta S_m. \tag{79}$$

Energia pentru menținere poate fi definită ca acea parte din energia biologică disponibilă, produsă prin catabolism, care nu este folosită pentru biosinteză. Ea reprezintă utilizarea ATP pentru : menținerea gradienților de concentrație între celulă și mediu, motilitatea celulei, resintetizarea compușilor instabili, precum și energia pierdută prin hidroliza ATP.

În aceaste condiții, randamentul

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta x}{\Delta S_c + \Delta S_m}. \tag{80}$$

În cazul în care $\Delta S_m = 0$, se obține randamentul „adevărat", care este constant.

Se admite că viteza de consum a substratului pentru menținere este proporțională cu concentrația celulară conform relației :

$$-\left(\frac{\Delta S_m}{\Delta t}\right) = mx, \tag{81}$$

în care : constânta de proporționalitate „m" se numește coeficient de menținere.

Ecuația de bilanț pentru sursa energetică este următoarea :

$$\begin{pmatrix}\text{viteza totală}\\ \text{de consum}\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}\text{viteza de consum}\\ \text{pentru creștere}\end{pmatrix} + \begin{pmatrix}\text{viteza de consum}\\ \text{pentru menținere}\end{pmatrix}$$

adică:

$$\frac{\Delta S_c}{\Delta t} = \frac{\Delta S}{\Delta t} + \frac{\Delta S_m}{\Delta t}. \quad (82)$$

Prin înmulţirea termenilor ecuaţiei (82) cu (—1) şi ţinînd seama de:

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta x}{\Delta S}; \ (Y_{x/s})_c = -\frac{\Delta x}{\Delta S_c}; \ mx = -\frac{\Delta S_m}{\Delta t},$$

ecuaţia (32) devine:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t} = \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)_c \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t} + mx. \quad (83\ a)$$

Pentru intervale de timp foarte mici, diferenţele finite se transformă în diferenţiale:

$$\lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{dx}{dt}$$

şi ecuaţia (83 a) se poate scrie sub forma:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)_c \frac{dx}{dt} + mx. \quad (83\ b)$$

Înlocuind pe $\frac{dx}{dt}$ cu expresia din ecuaţia (51), se obţine relaţia:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} \mu x = \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)_c \mu x + mx, \quad (84)$$

iar după împărţirea prin (μx):

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \left[\frac{1}{Y_{x/s}}\right]_c + \frac{m}{\mu}. \quad (85)$$

Se observă că ecuaţia (85) are o formă asemănătoare cu ecuaţia (71). Pentru determinarea parametrilor (m şi $Y_{x/s}$) se poate utiliza reprezentarea grafică $\frac{1}{Y_{x/s}} = f\left(\frac{1}{\mu}\right)$ (fig. 15).

Herbert şi apoi Marr (citaţi din Pirt, 1975) au definit energia pentru menţinere ca un consum de biomasă prin metabolism endogen, astfel:

$$\begin{pmatrix}\text{creştere}\\ \text{observată}\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}\text{creşterea}\\ \text{totală}\end{pmatrix} - \begin{pmatrix}\text{biomasă}\\ \text{consumată endogen}\end{pmatrix}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_T \cdot x - a \cdot x, \quad (86)$$

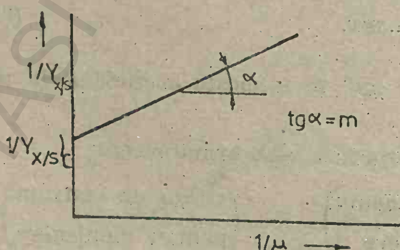


Fig. 15. Determinarea grafică a randamentului de substrat şi a coeficientului de menţinere (Pirt, 1975).

unde : μ_T este viteza specifică de creştere totală ;
a — viteza specifică de dispariție a biomasei.

Prelucrînd ecuația (86) şi notînd :

$$\mu_T - a = \mu,$$

se obține prin înlocuire în ecuația (85), relația :

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)_c + \frac{a}{\mu} \cdot \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)_c \tag{87}$$

unde : μ este viteza specifică de creştere observată.

Prin compararea ecuațiilor (85) şi (87) se observă că : $m = \left(\frac{a}{Y_{x/s}}\right)$. (88)

În literatură au fost propuse mai multe modele matematice care să exprime metabolismul de întreținere şi endogen. Cîteva dintre acestea sînt prezentate în tabelul 18.

Tabelul 18

Modele matematice bazate pe metabolismul de întreținere şi endogen (Moser, 1985)

Schema reacției	Ecuația modelului	Parametrii	Referință bibliografică
$S \xrightarrow{\nu} X$ $S \xrightarrow{m}$ menținere $S \xrightarrow{\mu} X_{viabile} \xrightarrow{a} X_{moarte}$	$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{(Y_{x/s})_c}\mu X + mX$ şi $\frac{dX}{dt} = \mu X$ $\frac{dX}{dt}(\mu - a)X$ şi $\frac{-dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}}\mu X$	$m = -\frac{1}{X}\left(\frac{dS_m}{dt}\right)$ $m = ct$ $a = ct$	Pirt (1965)
$k_d \neq const = f(S)$ (K_d = constanta de viteză pentru moarte)	$\mu_d = \mu_{d,max}\left(1 - \frac{s}{s + k_d}\right)$	K_d	Humphrey (1978)
$m \neq const = f(S)$ $S \xrightarrow{\nu} X_{viabile} \xrightarrow{a} X_{moarte}$ $S \xrightarrow{m}$ menținere	$m = m_{max} \cdot \frac{s}{K_e + s}$ $\frac{dx}{dt} = (\mu - a)x$ $\frac{-dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot x + m \cdot x$	K_e $a \neq const$ $m \neq const$	Gutke (1980)

Notă : k_d este constantă de viteză pentru moartea celulelor ;
μ_d — viteză specifică de moarte a celulelor ;
K_d — constantă tip de saturare pentru moartea celulelor ;
K_e — constantă tip de saturare pentru metabolismul endogen ;
m — coeficient de menținere ;
$\left(\frac{dX}{dt}\right)$; $\left(\frac{dS}{dt}\right)$ — viteză de variație a concentrației celulelor (respectiv a substratului).

Diferenţa dintre randamentul de substrat global ($Y_{x/s}$) şi randamentul de creştere constă în aceea că primul reprezintă o mărime direct măsurabilă în timp ce ultimul $(Y_{x/s})_c$ este un parametru bazat pe postularea unui model, valorile sale depinzînd de valabilitatea acestuia.

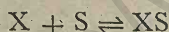
Deşi ecuaţia (88) asigură echivalenţa modelelor propuse de Pirt (ec 85) şi Herbert (ec. 87), între ele există totuşi o diferenţă. Primul model consideră că energia necesară menţinerii provine din consumul unei părţi din substrat (ipoteză plauzibilă în cazul existenţei unei cantităţi suficiente de substrat) în timp ce ultimul consideră că necesarul energetic pentru menţinere este asigurat pe seama unei părţi din biomasă care se autolizează (situaţie întîlnită în cazul consumării totale a substratului).

2.2.2.7. MODELE CU INHIBIŢIE DE SUBSTRAT SAU PRODUS

Cele mai multe modele de acest tip sînt deduse, ca şi ecuaţia M o n o d din teoria cineticii enzimatice, în care apar termenii de inhibiţie competitivă sau necompetitivă.

În cazul primului tip, inhibitorul intră în competiţie cu substratul, astfel încît acesta nu mai poate fi consumat de celule.

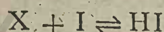
Schematic acest proces poate fi reprezentat astfel:



Constanta de disociere este:

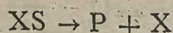
$$K_s = \frac{[X][S]}{[XS]} \qquad (89)$$

Analog, se poate scrie pentru inhibitor:



$$K_i = \frac{[X][I]}{XI[]} \qquad (90)$$

Etapa limitativă a procesului este reacţia de obţinere a produsului



a cărei viteză este dată de relaţia:

$$v_R = k\,[XS] \qquad (91)$$

Ţinînd seama de faptul că:

$$X = [X] + [XS] + [XI] \qquad (92)$$

unde: X este cantitatea de biomasă totală

şi aplicînd metoda stării staţionare, se obţine:

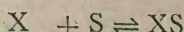
$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} \qquad (93)$$

unde: i este concentraţia inhibitorului.

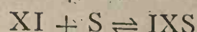
Prezenţa inhibitorului modifică alura curbei de creştere prin mărirea fazei de creştere decelerată (fig. 16).

În cazul inhibiției necompetitive, inhibitorul „reacționează“ cu biomasa în alți „centri activi“ decît cei folosiți pentru consumul substratului limitativ. Deci inhibitorul nu este competitiv în raport cu substratul, dar poate fi competitiv în raport cu un metabolit.

Procesul este descris de următoarele reacții:


$$X + S \rightleftharpoons XS$$

$$X + I \rightleftharpoons XI$$

$$XS + I \rightleftharpoons IXS$$

$$XI + S \rightleftharpoons IXS$$

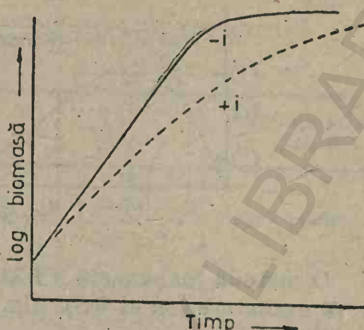


Fig. 16. Influența inhibiției competitive asupra creșterii (Pirt, 1975).

Se admite că prima și ultima reacție au aceeași constantă de disociere K_s, în timp ce pentru reacția a doua și a treia, constantă de disociere este K_i.

Pentru că complexul IXS nu conduce la formarea produsului, acesta se poate forma doar în urma reacției:


$$XS \rightleftharpoons X + P$$

a cărei viteză este limitativă pentru întregul proces.

Scriind expresiile concentrațiilor reactanților și exprimînd viteza specifică de utilizare a substratului ca o expresie în parametrul μ, Noack (1968) ajunge la următoarea formulă:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(S + K_s)\left(1 + \frac{S^2}{K_i}\right)} \qquad (94)$$

Influența inhibitorului necompetitiv asupra curbei de creștere este reprezentată în fig. 17.

Pentru estimarea parametrilor modelului, se utilizează de obicei reprezentarea ecuației (94), sub forma: $\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ (fig. 18).

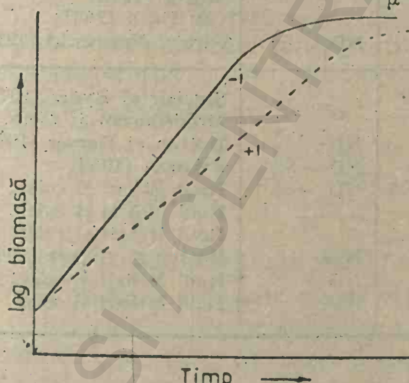


Fig. 17. Influența inhibiției necompetitive asupra creșterii (Pirt, 1975).

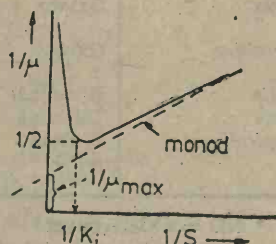


Fig. 18. Determinarea grafică a parametrilor modelului cu inhibiția de substrat (Noach, 1968):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_i}}$$

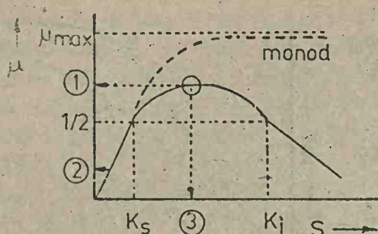


Fig. 19. Estimarea grafică a parametrilor modelului cu inhibiţie de substrat (Humphrey, 1978):

(1) $\mu = \frac{\mu_{max}}{1+2\sqrt{K_s/K_i}}$;

(2) $\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s}$;

(3) $\mu_{max} = \sqrt{K_s \cdot K_i}$.

O metodă mai exactă a fost propusă de Humphrey (1978) şi constă în reprezentarea $\mu = f(S)$ (fig. 19). Coordonatele maximului curbei sînt:

$$S = \sqrt{K_s \cdot K_i}; \tag{95}$$

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1+2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}}}. \tag{96}$$

Valorile unor constante K_s şi K_i pentru diferite drojdii şi substraturi sînt date în tabelul 19.

Tabelul 19

Valori ale constantelor de saturaţie şi inhibiţie pentru drojdii

Microorganismul	Substratul	K_s [ng·l⁻¹]	K_i [g·l⁻¹]	Referinţa bibliografică
C. boidinii	Metanol	680	ND*	Pilat şi Prokop (1975)
		550	16,44	Reuss şi colab. (1975)
S. cerevisiae	Etanol	20	ND	Morr şi Fiechter (1968)
C. utilis	Acetat	1 370	20,53	Cama şi Edwards (1970)
		500–1200	16 27	Jakson şi Edwards (1975)
S. cerevisiae	Glucoză	100		Wards (1975)
				van Uden (1967)
S. cerevisiae	Glucoză	25	ND	Pirt şi Vurovschi (1970)
C. utilis	Oxigen	$8,4 \cdot 10^{-2}$		Sinclair şi Ryder (1975)
C. boidinii	Oxigen	1		Middelhoven şi colab. (1976)
Candida	Oxigen	0,45	ND	Button şi Garver (1966)
		0,042	ND	Johnson (1967)
S. cerevisiae	Oxigen	0,03÷0,06	ND	Raul Mihail şi colab. (1988)
		0,1		Raul Mihail şi colab. (1988)
C. utilis	Glicerină	4,5		Raul Mihail şi colab. (1988)
Candida	Glicerină	4,5	ND	Button şi Garver (1966)
C. tropicalis	Glucoză	12	ND	Raul Mihail şi colab. (1988)
	n-C_{16}	110	ND	Raul Mihail şi colab. (1988)

* ND = nedeterminat

Moser (1985) face o clasificare a modelelor matematice care descriu creşterea microorganismelor în cazul inhibiţiei prin substrat (tabelul 20).

Există cazuri în care produsul format poate inhiba creşterea celulelor. Unul dintre cele mai cunoscute exemple îl constituie inhibiţia necompetitivă a creşterii drojdiilor de către etanol. Modelele propuse introduc în plus do

Modele cinetice pentru creşterea cu inhibiţie de substrat
(Moser, 1985)

Modelul	Referinţa bibliografică
$\mu = \mu_{max}\dfrac{1}{1+\dfrac{K_s}{S}+\dfrac{S}{K_i}} \approx \mu_{max}\dfrac{S}{S+K_s}\cdot\dfrac{1}{1+\dfrac{S}{K_i}}$	Noack (1968)
$\mu = \mu_{max}\dfrac{S(1+\beta\cdot S/K_s')}{S+K_s+S^2K_s'}$	Webb (1963)
$\mu = \mu_{max}\dfrac{S}{S+K_s(1+\sigma/K_i)}\,e^{1,17\cdot\sigma}$ σ = tăria ionică	Webb (1963)
$\mu = \mu_{max}\dfrac{1}{1+K_s/S+\sum_{j=1}^{m}(S/K_i)^j}$	Yano (1966)
$\mu = \mu_{max}\dfrac{S}{S+K_s}\,e^{-S/K_i}$	Aiba (1968)
$\mu = \mu_{max}\dfrac{S}{S+K_s} - K_i(S-S_c)$	Waymann (1976)
$\mu = \mu_{max}[\exp(-S/K_i) - \exp(-S/K_s)]$	tip Teissier

parametri : P — concentraţia produsului şi P^* — concentraţia produsului la care creşterea încetează.

Han şi Levenspiel (1988) propun o formă generalizată a ecuaţiei Monod care să ţină seama de toate tipurile de inhibiţie. Acest model presupune existenţa unei concentraţii critice, c_i, la atingerea căreia, celulele nu mai pot creşte.

Expresia propusă are forma :

$$\mu = \mu_{max}\left(1-\frac{C_i}{C_i^*}\right)^n \frac{S}{S+K_s\left(1-\dfrac{C_i}{C_i^*}\right)^m}, \qquad (97)$$

unde : m şi n sînt constante numerice ;

C_i poate fi concentraţia substratului, produsului sau celulelor, după cum este vorba de inhibiţie prin substrat, produs sau celule.

În cazul în care $C_i \leqslant C_i^*$, această expresie se reduce la ecuaţia Monod. Constantele din ecuaţia (97) pot fi determinate printr-o linearizare de tip Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s(1-C_i/C_i^*)^m}{\mu_{max}(1-C_i/C_i^*)^n}\cdot\frac{1}{S} + \frac{1}{\mu(1-C_i/C_i^*)^n} =$$

$$= \frac{(K_s)_{obs}}{(\mu_{max})_{obs}}\cdot\frac{1}{S} + \frac{1}{(\mu_{max})_{obs}}. \qquad (98)$$

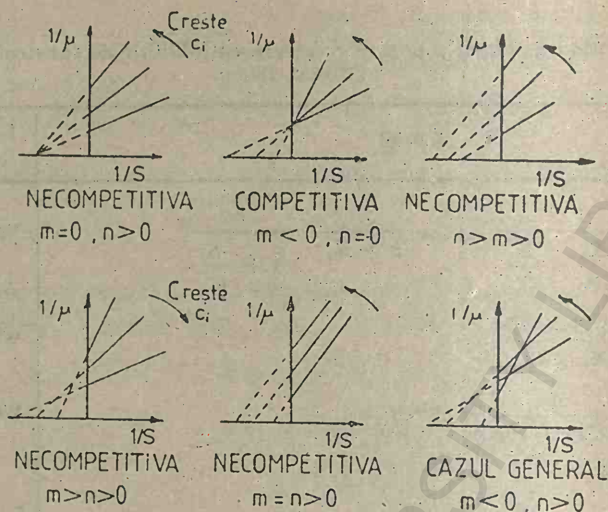


Fig. 20. Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru diverse cazuri de inhibiţie, bazată pe ecuaţia (97) (Han şi Levenspid, 1988).

În funcţie de valorile parametrilor m şi n, se pot deosebi mai multe cazuri (figura 20):

$n > 0$, $m = 0$ inhibiţie necompetitivă;
$n = 0$, $m < 0$ inhibiţie competitivă;
$n > 0$, $m > 0$ inhibiţie necompetitivă generalizată;
$n = m > 0$ inhibiţie necompetitivă;
$n > 0$, $m < 0$ cazul general.

Valorile $(\mu_{max})\,\sigma_{obs}$ şi $(K_s)_{obs}$ se obţin prin intersectarea dreptelor ca axele de coordonate (fig. 21 şi 22):

$$(\mu_{max})_{obs} = \mu_{max}\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^n; \tag{99}$$

şi

$$(K_s)_{obs} = K_s\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^m. \tag{100}$$

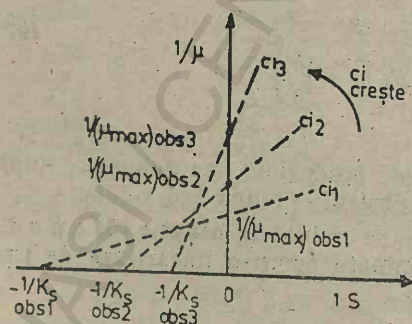


Fig. 21. Evaluarea lui μ_{max} şi K_s din ecuaţia (98) (Han şi Levenspied, 1988).

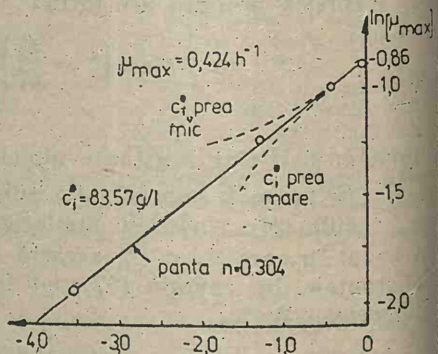


Fig. 22. Evaluarea parametrilor K_s, n, C_i (i = inhibitor; alcool) pe baza ecuaţiei (103) pentru fermentaţia alcoolică; datele sînt cele prezentate în tabelul 21. (Bazua şi Wilke, 1977).

Pentru determinarea parametrilor μ_{max} şi n, se fac o serie de cultivări la concentraţie de inhibitor din ce în ce mai mare.

Dacă se cunoaşte concentraţia critică a inhibitorului, se poate utiliza ecuaţia :

$$\ln(\mu_{max})_{obs} = \ln \mu_{max} + n \ln\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right) \tag{101}$$

obţinută prin logaritmarea ecuaţiei (99).

Reprezentînd grafic $\ln(\mu_{max})_{obs}$ în funcţie de $\ln\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)$, se obţine o pantă de dreaptă n.

În cazul în care nu se cunoaşte valoarea concentraţiei critice, c_i^*, aceasta poate fi determinată prin încercări.

Analog, pentru determinarea lui X_s şi m se poate utiliza ecuaţia (102), obţinută prin logaritmarea ecuaţiei (100) :

$$\ln(K_s)_{obs} = m \ln\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right) + \ln K_s. \tag{102}$$

Pentru exemplificarea celor afirmate, considerăm exemplul fermentaţiei alcoolice, în care alcoolul, produsul de reacţie, inhibă creşterea. B a z ú a şi W i l k e (1977) au făcut 108 cultivări într-un reactor cu amestecare perfectă, în regim continuu, utilizînd ca microorganism o tulpină de *Saccharomyces cerevisiae* (substrat-glucoză, $T = 30°C$, $pH = 4$) şi au propus modelul următor :

$$\mu = \mu_{max}\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^n \left(\frac{S}{S + K_s}\right). \tag{103}$$

Reprezentînd datele lor, ca în fig. 22, se obţin valorile $(\mu_{max})_{obs}$ şi $(K_s)_{obs}$ cuprinse în tabelul 21.

Tabelul 21

Valorile parametrilor modelului lui Han şi Levenspiel

$C_i = C_{alcool}$ [g/l]	$(\mu_{max})_{obs}$ [h^{-1}]	$(K_s)_{obs}$ [g/l]
4,37	0,415	0,230
29,19	0,368	0,230
61,29	0,289	0,259
81,30	0,141	0,223

Deoarece $(K_s)_{obs}$ nu se modifică într-o anumită direcţie, poate fi considerat constant, indiferent de concentraţia produsului inhibitor.

Deci, conform ecuaţiei (100), $m = 0$, relaţia (97) se va reduce la :

$$\mu = \mu_{max}\left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^n \frac{S}{S + K_s} \tag{104}$$

ecuaţia propusă de L e v e n s p i e l (1980).

Deoarece în articolul original nu se dă valoarea lui C_i^*, ea se va determina ca în fig. 22 şi este utilizată pentru determinarea lui n şi μ_{max}. Rezultatul final este dat de :

$$(\mu_{max})_{obs} = 0{,}424\left(1 - \frac{C_i}{83{,}57}\right)^{0,304} \tag{105}$$

faţă de relaţia lui Bazua şi Wilke (1977) :

$$(\mu_{max})_{obs} = 0{,}448(1 - C_i/93{,}6)^{0,5}. \tag{106}$$

Aiba şi colab. (1968) au propus relaţia

$$\mu = \mu_m \frac{S}{S+K_s} \exp(-K \cdot C_i). \tag{107}$$

Utilizînd cele mai bune valori ale parametrilor obţinute de ei, vom avea :

$$(\mu_{max}) = 0{,}494 \exp(-0{,}013C_i). \tag{108}$$

2.2.3. INFLUENŢA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA CREŞTERII MICROORGANISMELOR

2.2.3.1. EFECTELE TEMPERATURII

Temperatura mediului în care are loc procesul de biosinteză este un factor extrem de important pentru activitatea microorganismelor.

Temperatura este un factor care acţionează în mod direct asupra microorganismului viu ; diferenţa între temperatura mediului înconjurător şi cea din interiorul celulei trebuie să fie nulă.

Din punct de vedere al procesului de biosinteză desfăşurat la scară industrială, temperatura ar putea fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanţi, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variaţiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerinţelor nutritive ale microorganismului şi compoziţiei biomasei obţinute şi, nu în ultimul rînd, asupra vitezei de creştere microbiană.

Clasificarea microorganismelor în funcţie de domeniul de temperatură în care ating viteza maximă de creştere este redată grafic în fig. 23.

Temperatura afectează eficienţa conversiei sursei de carbon/energie în masă celulară. Afirmaţia este ilustrată de rezultatele obţinute de Snede-

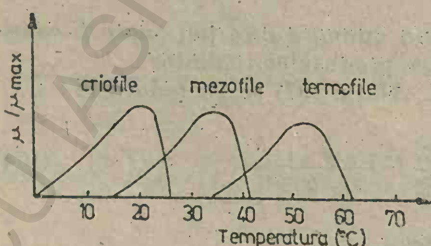


Fig. 23. Influenţa temperaturii asupra creşterii microorganismelor (Cooney, 1981).

cor și Cooney (1974) la cultivarea unei drojdii, *Hansenula polymorpha*, pe substrat de metanol (fig. 24).

Maximul randamentului de conversie a substratului se înregistrează la o temperatură mai scăzută decît cea la care se obține viteza maximă de creștere. Acest fapt ridică o problemă de optimizare a procesului. Varianta pentru care se optează, viteza specifică maximă de creștere microbiană sau randamentul maxim de transformare a substratului, se obține ca soluție a unui calcul de optimizare în care intervin mai mulți factori (accesibilitatea și prețul de cost al substratului, importanța și valoarea economică a produsului obținut, restricțiile impuse de protecția mediului etc.).

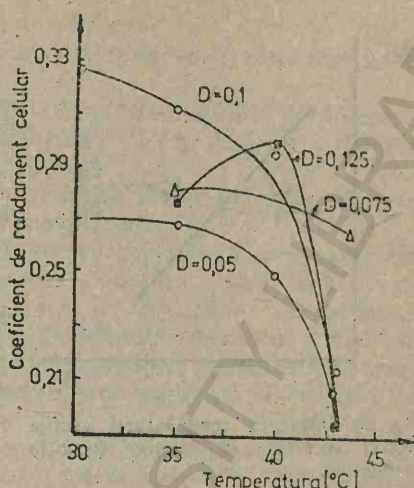


Fig. 24. Efectul temperaturii asupra randamentului celular pentru *Hansenula polymorpha* (metanol) la diverse diluții (Cooney, 1974).

Dependent, de asemeni, de temperatură este necesarul în factorul de creștere al microorganismului.

O dovadă o aduc experimentele lui Beyeu și Lichstein (1963) cu *Saccharomyces cerevisiae*. Cei doi cercetători au stabilit că creșterea drojdiei la 38°C față de 30°C necesită în plus acid pantotenic și clorură de sodiu.

Pe baza datelor din literatură publicate, nu este surprinzător faptul că variațiile de temperatură afectează multe procese metabolice din celulă, precum și compoziția biomasei în proteine și lipide, conținutul în ARN al celulei (Hunter și Rose, 1972). Raportul dintre conținutul în ARN al drojdiilor și viteza lor de creștere se mărește la scăderea temperaturii.

Conținutul în proteină al drojdiilor poate scădea sau crește la o variație a temperaturii, în funcție de natura substratului limitativ de creștere. Atunci cînd temperatura scade, proporția de acizi grași nesaturați în conținutul de lipide din drojdii va crește. Este posibil ca structura lipidică a membranei celulare să se modifice continuu în funcție de variațiile de temperatură, astfel încît membrana să-și mențină funcția regulatoare.

Dependența vitezei de creștere a microorganismelor de temperatură este un subiect care comportă multe aspecte importante.

Interesant din punct de vedere al aplicării industriale este domeniul în care se obține viteza maximă de creștere a microorganismelor. De obicei, acest domeniu nu depășește ca întindere 10°C și se află plasat pentru microorganismele de interes industrial, în intervalul 25...35°C.

Dependența vitezei de creștere microbiene cu temperatura s-a stabilit prin analogie cu relația existentă între viteza unei reacții chimice și temperatură.

Legea de variație a vitezei unei reacții chimice cu temperatura a fost formulată pentru prima dată de Arrhenius și ea este folosită și astăzi în forma:

$$v = Ae^{-E_a/RT}, \tag{109}$$

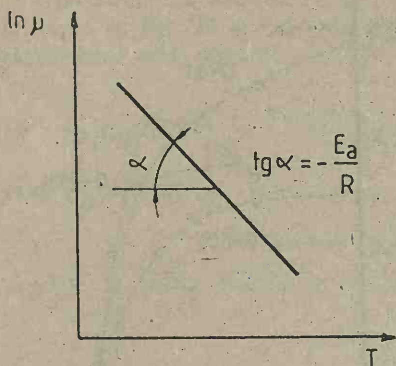


Fig. 25. Influența temperaturii asupra vitezei specifice de creștere (ecuația Arrhenius).

unde : v este viteza reacției chimice ;
A — constanta lui Arrhenius ;
R — constanta universală a gazelor ;
T — temperatura absolută ;
E_a — energia de activare a reacției chimice.

Prin substituirea în ecuația (109) a vitezei reacției chimice cu viteza specifică de creștere microbiană, μ, se obține o relație de dependență, valabilă în domeniul de temperatură suboptimal, de forma :

$$\mu = Ae^{-E_a/RT}. \qquad (110\ a)$$

Prin logaritmarea ecuației (110 a), se obține :

$$\ln \mu = \ln A - \frac{E_a}{RT}. \qquad (110\ b)$$

Reprezentarea grafică a relației (110 b), $\ln \mu = f\left(\frac{1}{T}\right)$ este o linie dreaptă cu panta $\left(-\frac{E_a}{R}\right)$, fapt care permite estimarea grafică a energiei de activare (fig. 25).

Valorile tipice ale energiei de activare pentru creșterea microbiană sînt cuprinse între 13 și 17 kcal/mol. Reacțiile de creștere a microorganismelor au loc cu o mare degajare de căldură. O problemă dificilă în practica industrială este îndepărtarea surplusului de căldură și implicit volumul mare de apă de răcire necesar.

O soluție pentru rezolvarea acestor probleme ar putea fi crearea de tulpini de drojdii mezofile care să crească la temperatură supraoptimală, adică în domeniul cuprins între temperatura optimă și cea maximă de creștere.

În domeniul de temperatură supraoptimală, creșterea este concurată de moartea microorganismelor. În acest caz, μ din ecuația (110 a) este o viteză aparentă, ea fiind de fapt :

$$\mu_a = \mu_c - \mu_m, \qquad (111\ a)$$

unde : μ_c este viteza specifică de creștere a microorganismelor ;
μ_m — viteza specifică de moarte a microorganismelor.

Viteza de moarte a microorganismelor este o funcție puternic dependentă de temperatură, fiind caracterizată prin valori ale energiei de activare de 70—90 kcal/mol.

Pentru domeniul de creștere la temperaturi supraoptimale au fost propuse și alte tipuri de dependențe viteză-temperatură, de exemplu sub forma unei legi de puteri :

$$\mu = b(T - T_{min})(1 - e^{c(T-T_{max})}), \qquad (112)$$

unde : μ este viteza specifică (aparentă) de creştere ;
T_{min} şi T_{max} — temperaturile la care viteza se poate considera nulă ;
b şi c — constante empirice.

Studii aprofundate asupra comportării drojdiilor mezofile la temperaturi supraoptimale, în chemostat, au întreprins Van Uden (1969) şi Van Uden şi Madeira-Lopes (1976).

În primul articol citat, Van Uden expune bazele teoretice ale creşterii drojdiilor mezofile la temperaturi supraoptimale.

Astfel, în cazul unei cultivări discontinue la temperatură supraoptimală se manifestă, pentru o perioadă scurtă, doar creşterea exponenţială fără moarte. Explicaţia propusă de Van Uden se bazează pe un model de creştere care presupune că celulele conţin o multitudine de centri activi termosensibili. Aceşti centri sînt inactivaţi exponenţial şi numai atunci cînd numărul lor este redus la unul per celulă, începe să se manifeste vizibil moartea exponenţială a celulelor.

În partea inferioară a zonei de temperatură supraoptimală, $\mu_m < \mu_c$. În consecinţă creşterea este exponenţială cu o viteză aparentă dată de ecuaţia (111 a).

În partea superioară a domeniului de temperatură supraoptimală, $\mu_m > \mu_c$, iar viteza aparentă devine :

$$\mu_a = \mu_m - \mu_c. \tag{111 b}$$

Atunci cînd moartea exponenţială concurează creşterea exponenţială, în regim chemostat, populaţia totală (x^T) este compusă din celule viabile (x^v) şi celule neviabile (x^{nv}). Viteza de variaţie a celulelor viabile depinde de viteza specifică de creştere (μ_c), viteza specifică de moarte (μ_m) şi viteza de diluţie (D):

$$\frac{dx^y}{dt} = \mu_0 x^v - Dx^v - \mu_m x^v. \tag{113}$$

În stare staţionară : $\frac{dx^v}{dt} = 0$, adică :

$$\mu_c = \mu_m + D. \tag{114}$$

În stare staţionară „spălarea" întregii populaţii este echilibrată de viteza de creştere a populaţiei viabile :

$$\mu_c x^v = Dx^T. \tag{115}$$

Proporţiile de populaţie viabilă şi respectiv neviabilă din totalul populaţiei sînt date de următoarele relaţii :

$$\frac{x^v}{x^T} = \frac{D}{D + \mu_m} ; \tag{116 a}$$

$$\frac{x^{nv}}{x^T} = \frac{\mu_m}{D + \mu_m} . \tag{116 b}$$

Pentru că în chemostat, în stare staţionară, $D = \mu_c - \mu_m$ (114), înseamnă că limita maximă a lui D, adică aceea la care are loc „spălarea" culturii, scade o dată cu creşterea temperaturii supraoptimale, mai puternic chiar decît μ_{max}. Drept urmare, valorile permise pentru D la temperaturi supraoptimale trebuie să fie destul de scăzute pentru ca cerinţele de menţinerea culturii să nu ajungă să aibă un efect negativ semnificativ asupra coeficientului de conversie a substratului în produs.

În experimentele efectuate, Van Uden și Madeira-Lopes (1976) au obținut rezultate cu o tulpină *Saccharomyces cerevisiae*, la 39°C, în cultură chemostat, cu substrat limitativ-glucoză.

Randamentele de utilizare a glucozei pentru menținerea celulelor viabile și ca sursă de energie disipată de către celulele neviabile au reprezentat 33–28% și respectiv 15–9% din randamentul total de utilizare a substratului, în domeniul de viteze de diluție tastat ($D = 0{,}038-0{,}064\ h^{-1}$). În aceste condiții de temperatură randamentul de transformare a glucozei în produs a fost de 0,066–0,085 g biomasă uscată/g glucoză. În condiții normale de creștere, randamentul de transformare a glucozei este de aproximativ 0,5 g/g, pentru o tulpină de *Saccharomyces*.

Crescînd viteza de diluție la 0,09 h^{-1} (valoare la care apare „spălarea" culturii), randamentele de utilizare a glucozei pentru menținerea celulelor viabile și respectiv ca sursă pentru energia disipată de celulele neviabile, vor fi 24% și respectiv 7% din randamentul total de utilizare a glucozei.

2.2.3.2. EFECTUL *P*H-ULUI

Valoarea *p*H-ului este, alături de temperatură, un parametru important în procesele de biosinteză.

*P*h-ul se exprimă prin concentrația ionilor de hidrogen [H^+], sau prin activitatea ionilor de hidrogen, a_H. Între cei doi parametri există o relație de proporționalitate de tipul:

$$a_H = f\,[H^+], \tag{117}$$

unde: f este coeficientul de activitate, dependent de tăria ionică a mediului.

Exprimarea matematică a *p*H-ului este dată de relația:

$$pH = -\log(a_H), \tag{118 a}$$

iar în cazul în care $f = 1$ (soluție diluată de săruri) și deci $a_H = [H^+]$ se poate scrie:

$$pH = -\log[H^+]. \tag{118 b}$$

Influența valorii *p*H-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene se poate urmări în cîteva direcții:

1) Efectul *p*H-ului asupra vitezei de creștere a microorganismelor.

În general microorganismele au un domeniu optim de *p*H pentru dezvoltare, în care viteza specifică de creștere atinge valoarea maximă. Reprezentarea grafică a dependenței vitezei specifice de creștere de *p*H este dată în fig. 26.

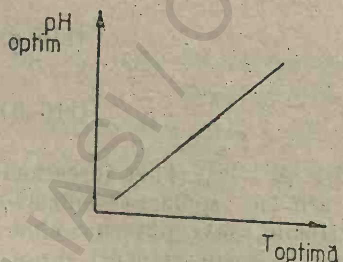


Fig. 26. Corelația $pH_{optim} - T_{optim}$ pentru creșterea microorganismelor (Brock, 1967).

Pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de *p*H se situează între valorile de *p*H 4 și 5.

Există însă și specii de drojdii care cresc la valori de *p*H în jur de 2 sau dimpotrivă la valori ridicate ale *p*H-ului în jur de 8 (biosinteza fenilaninei cu o drojdie din genul *Rhodotorula*).

Cultivările cu drojdii care decurg la o valoare a *p*H-ului de 4 sau mai mică

prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare bacteriană, ceea ce este în mod deosebit de apreciat în cazul unei cultivări la scară industrială, în sistem continuu (obținerea de biomasă proteică prin cultivarea unei drojdii din genul *Candida* pe substrat de *n*-alcani, în sistem continuu).

Expresiile matematice care exprimă dependența viteză specifică de creștere — *p*H sînt, de obicei, relații polinomiale (Raul Mihail și colab., 1988):

$$\mu = \mu_{max}(a_1 + a_2pH + a_3pH^2 + \ldots + a_npH^{n-1}). \quad (119)$$

2) Efectul valorii *p*H-ului asupra randamentului de conversie a substratului la un anumit produs.

Formarea produsului dorit în urma procesului de biosinteză poate să fie legată de desfășurarea bioprocesului într-un domeniu foarte strict de *p*H. Un exemplu concludent este obținerea prin biosinteză a acidului citric, care are loc cu randament maxim la valori ale *p*H-ului cuprinse între 1,7 și 2. S-a constatat experimental că la valori ale *p*H-ului mai mici ca 3, produsul principal este acidul citric, în timp ce la valori de *p*H mai mari ca 3 rezultă în cantități semnificative acid oxalic și acid gluconic (Rohr și colab., 1983).

3) Între valorile optime ale *p*H-ului și temperaturii există o relație liniară (fig. 26).

4) În timpul dezvoltării unei culturi microbiene apar deviații ale *p*H-ului de la valoarea considerată optimă, care pot avea urmări nedorite asupra procesului de biosinteză. Aceste modificări se pot datora fie consumării unui nutrient (consumarea sursei de carbon în cazul cultivării drojdiilor metilotrofe, sau consumarea sursei de azot, amoniac gazos sau soluție, în cazul cultivării drojdiilor pe substrat de *n*-parafine), fie producerii unui acid organic de către microorganism (biosinteza acidului citric, folosind o drojdie din genul *Candida* pe substrat de *n*-alcani).

Pentru corectarea *p*H-ului la valoarea prescirsă se adaugă diverse substanțe chimice (acizi sau baze), alese în funcție de mai mulți factori.

În cazul în care valoarea *p*H-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corecție, soluții de NaOH sau KOH în funcție de compoziția chimică a mediului și de necesarul în ioni de Na^+ și K^+ al microorganismului. În același scop este mult răspîndită utilizarea amoniacului gazos sau soluție, fiind preferat amoniacul gazos deoarece NH_4OH chiar în soluție concentrată poate fi contaminat cu spori bacterieni.

În situația în care valoarea *p*H-ului este peste cea prescrisă se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic în funcție de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creșterea), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric să nu ducă la formarea unor săruri greu solubile) precum și de materialul de construcție al vaselor de reacție și al bioreactoarelor (probleme de coroziune).

5) Prin efectul de disociere a acizilor și bazelor, *p*H-ul acționează asupra caracteristicilor suprafeței celulei, modificînd proprietățile ei de aderare la diverse materiale (sticlă, metale), precum și cele de floculare.

2.2.3.3. EFECTUL ACTIVITĂȚII APEI

Apa este importantă pentru celula microbiană nu numai pentru că ea reprezintă circa 80% din greutatea celulei vii, ci și pentru că îndeplinește patru funcții de bază în celulele vii (Pirt, 1975):

— ca reactant chimic prezent în celulă, apa participă la reacțiile de hidroliză;

— ea acţionează ca solvent pentru metaboliţii intracelulari ;

— apa are un rol mecanic important în menţinerea formei şi dimensiunilor celulei impuse de presiunea hidrostatică care ia naştere în interiorul celulei ;

— ea îndeplineşte o funcţie structurală în hidratarea proteinelor şi a altor componente celulare ; această ultimă funcţie depinde de uşurinţa cu care apa formează legături de hidrogen cu grupările polare.

„Disponibilitatea" apei din mediul înconjurător pentru celulă se poate exprima în termeni de presiune osmotică, tonicitatea mediului sau activitatea apei.

Activitatea apei într-o soluţie poate fi exprimată în termenii unei presiuni de vapori a apei sau, mai simplu, prin raportarea activităţii apei dintr-o soluţie (a_s) la cea a apei pure (a_p). Prin urmare, se poate exprima activitatea apei dintr-o soluţie ca raportul dintre presiunea de vapori a apei în soluţie (p_s) şi cea a apei pure (p_a), la aceeaşi temperatură :

$$a_a = \frac{p_s}{p_a}. \quad (120)$$

Dacă se notează :

n — numărul de moli de substanţă dizolvată în soluţie ;

N — numărul de moli de apă din soluţie, se poate exprima activitatea apei şi prin următorul raport

$$a_a = \frac{N}{n+N}. \quad (121)$$

Relaţia dintre activitatea apei şi presiunea osmotică se defineşte în termodinamica chimică şi ea este de forma (Murgulescu şi Vîlcu, 1982):

$$\pi = -\frac{RT}{V_m} \ln a_a, \quad (122)$$

unde : π este presiunea osmotică a soluţiei ;

V_m — volumul unui mol de apă ;

R — constanta universală a gazelor ;

T — temperatura absolută ;

a_a — activitatea apei într-o soluţie.

Osmolalitatea reală a unei soluţii (m_0) se leagă de activitatea apei printr-o relaţie (Pirt, 1975) ;

$$m_0 = -128 \log a_a. \quad (123)$$

Termenul de activitate a apei s-a dovedit folositor în studiile asupra mediilor concentrate. Pentru mediile de cultivare diluate folosite în scopul dezvoltării microorganismelor se foloseşte termenul de osmolalitate reală, sau presiune osmotică, dat fiind că activitatea apei variază foarte puţin faţă de unitate.

În general s-a acordat puţină importanţă influenţei acestui parametru (activitatea apei) asupra creşterii microorganismelor.

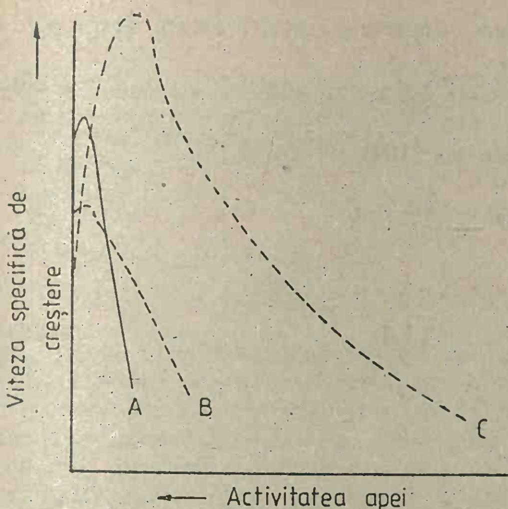


Fig. 27. Influenţa activităţii apei asupra vitezei specifice de creştere, pentru trei microorganisme (Pirt, 1975).

Dependenţa vitezei specifice de creştere a microorganismelor de activitatea apei este redată grafic în fig. 27.

Microorganismele răspund diferit la acţiunea acestui factor. Bacteriile sînt mult mai sensibile la activitatea apei decît mucegaiurile şi drojdiile (Cooney, 1981). Aceasta poate deveni o metodă de prevenire a contaminării bacteriene în culturile cu drojdii. Reducînd activitatea apei sub 0,95, bacteriile nu vor mai creşte. Ea va trebui scăzută sub 0,7 pentru a preveni creşterea mucegaiurilor, valoarea minimă a activităţii apei la care mai cresc drojdiile osmofile fiind $\approx 0{,}6$.

2.3. SISTEME DE CULTIVARE

Ţinînd seama de marea varietate a bioproceselor este necesară clasificarea lor. Din punctul de vedere al inginerului, cele mai interesante criterii de clasificare se bazează pe modul de operare şi pe tipul de reactor utilizat.

Potrivit primului criteriu, procesele de biosinteză pot fi conduse în regim discontinuu (şarjă), semicontinuu sau continuu. Cultivarea continuă poate fi realizată în două tipuri de reactoare ideale : *R* şi *D*. Idealizarea constă în faptul că se impun condiţii restrictive deosebit de drastice circulaţiei fazei lichide în reactor : pentru reactorul *R* (recirculaţie) se impune amestecarea perfectă, deci un grad foarte mare de omogenitate, iar în cazul reactorului *D* (deplasare) se consideră o curgere tip piston. În cele ce urmează, rezolvarea ecuaţiilor caracteristicie ale reactoarelor se va face în ipoteza existenţei unui regim izoterm.

2.3.1. CULTIVAREA ÎN ŞARJĂ (BIOREACTORUL DISCONTINUU)

În capitolul anterior s-a arătat că dinamica populaţiei microbiene poate fi descrisă de o ecuaţie de tip Malthus: $\frac{dx}{dt} = \mu x$ (124) iar variaţia concentraţiei substratului prin relaţia :

$$x - x_0 = Y_{x/s}(S_0 - S) \tag{125}$$

sau

$$S = S_0 - \frac{x - x_0}{Y_{x/s}}. \tag{125}$$

Dacă pentru viteza specifică de creştere admitem o cinetică de tip Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}, \tag{126}$$

prin înlocuirea lui μ din (126) în ecuaţia (124) se obţine:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} \cdot x, \tag{127}$$

sau

$$\int_{x_0}^{x} \frac{S + K_s}{\mu_{max} \cdot S \cdot x} dx = \int_{t_0}^{t} dt, \tag{128}$$

deoarece la $t = t_0 \quad x = x_0$

$t = t \quad x = x.$

Deci timpul necesar obţinerii unei concentraţii celulare x se poate calcula astfel:

$$t - t_0 = \frac{1}{\mu_{max}} \int_{x_0}^{x} \left(\frac{K_s}{S \cdot x} + \frac{1}{x} \right) dx. \tag{129}$$

Înlocuind pe S din (125) se obţine:

$$t - t_0 = \frac{1}{\mu_{max}} \int_{x_0}^{x} \left[\frac{K_s Y_{x/s}}{(\alpha - x)x} + \frac{1}{x} \right] dx \tag{130}$$

pentru $\alpha = x_0 + Y_{x/s} \cdot S_0$.
Notînd $x_0 + Y_{x/s} \cdot S_0 + K_s \cdot Y_{x/s} = \beta$, relaţia (130) devine:

$$t - t_0 = \frac{\beta - \alpha}{\mu_{max}} \int_{x_0}^{x} \left(\frac{1}{(\alpha - x)x} + \frac{1}{(\beta - \alpha)} \cdot \frac{1}{x} \right) dx \tag{130'}$$

sau

$$t - t_0 = \frac{\beta}{\alpha \mu_m} \ln \left[\left(\frac{x}{x_0} \right) \cdot \left(\frac{x - \alpha}{x_0 - \alpha} \right)^{\frac{\alpha}{\beta} - 1} \right] \tag{130''}$$

Observaţie. Se consideră că t_0 reprezintă momentul de începere al fazei exponenţiale.

Caz particular:

Cînd $S \gg K_s$, $\frac{S}{S + K_s} \to 1$ şi se obţine:

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{x}{x_0}.$$

Determinarea duratei reacţiei pentru cazul general se poate face şi grafic, dacă reprezentăm datele experimentale ca $\frac{1}{\Delta x / \Delta t} = f(x)$ şi planimetrăm suprafaţa de sub curbă (fig. 28) (Mihail şi Muntean, 1984).

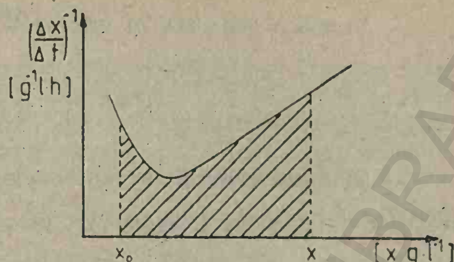


Fig. 28. Determinarea duratei reacției în cazul ceneral prin metoda planimetrării orei de sub gurbă (Mihail și Muntean, 1984).

2.3.2. CULTIVAREA CONTINUĂ

În cazul cultivării microorganismelor în sisteme închise (șarjă), pe măsura creșterii populației, mediul de cultură își modifică compoziția atît datorită consumării nutrienților cît și datorită formării unor produși secundari ce se acumulează în sistem. Pe de altă parte, existența timpilor morți (încărcare, descărcare, sterilizare) și a perioadei de lag micșorează gradul de utilizare a reactorului. Ținînd seama și de faptul că în cazul cultivării în șarjă, comportarea populației la un moment de timp t depinde de „istoria" dezvoltării anterioare, se poate înțelege interesul pe care tehnica cultivării continue l-a suscitat în ultimii 30 de ani.

2.3.2.1. BIOREACTORUL CONTINUU CU AMESTECARE PERFECTĂ *(R)*

Prelungirea fazei de creștere exponențială un timp nedefinit este posibilă prin adăugarea continuă în reactor a unei soluții de mediu proaspăt cu un debit volumetric F și eliminarea continuă a biomasei cu același debit, astfel încît volumul biomasei din fermentator să rămînă constant.

Pentru analiza teoretică a comportării populației microbiene în cazul sistemului de cultivare continuă, se face ipoteza amestecării instantanee a mediului proaspăt cu biomasă existentă, ceea ce conduce la egalitatea concentrațiilor din bioreactor cu cele din efluent.

Pentru stabilirea ecuației ce guvernează dezvoltarea microorganismelor, trebuie să ținem seama de faptul că variația concentrației biomasei este datorată existenței a două fenomene antagoniste :

— creșterea numărului (cantității) microorganismelor datorită dezvoltării populației ;

— scăderea cantității de microorganisme datorită eliminării lor din sistem.

Ecuația de bilanț de masă pentru biomasă este :

biomasă alimentată + biomasă existentă + biomasă generată = biomasă rămasă + biomasă ieșită cu efluentul (131)

Deoarece în reactor se alimentează doar mediu (care nu conține celule), primul termen va fi egal cu zero. Considerînd că bilanțul este calculat pentru un interval mic de timp Δt, iar la momentul inițial concentrația biomasei este x, putem admite că, la momentul $t + \Delta t$, ea va avea valoarea $x + \Delta x$ (adică va crește cu Δx).

Știind că masa celulelor se obține prin înmulțirea concentrației lor cu volumul de lucru (despre care am presupus că este constant), ceilalți termeni din ecuația (8) pot fi calculați astfel :

— biomasa existentă : $x \cdot V \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g]$

— biomasa generată în intervalul de timp Δt de către celulele inițiale:

$$\mu x \Delta t v \left[\frac{1}{h} \cdot \frac{g}{l} \cdot h \cdot l\right] = [g]$$

— biomasa rămasă în reactor la momentul $t + \Delta t$, va avea concentrația $x + \Delta x$ și va fi egală cu : $(x + \Delta x)V \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g]$

— biomasă ieșită în intervalul Δt : $(x + \Delta x)\Delta t F \left[\frac{g}{l} \cdot h \cdot \frac{l}{h}\right] = [g]$

Introducînd termenii explicitați în ecuația (130) se obține :

$$x \cdot V + \mu x \Delta t V = (x + \Delta x)V + (x + \Delta x)F\Delta t. \quad (132)$$

Înmulțind, reducînd termenii asemenea și neglijînd pe $F\Delta x\Delta t$, care este foarte mic, se obține :

$$\mu x \Delta t V = xV + Fx \neq \Delta t. \quad (133)$$

Împărțind prin $V\Delta t$:

$$\mu x = \frac{\Delta x}{\Delta t} + \frac{F}{V} x. \quad (134)$$

Cum $\lim\limits_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{dx}{dt}$, ecuația (134) devine :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \frac{F}{V} x. \quad (135)$$

Notînd $\frac{F}{V} = D\ [h^{-1}]$ — viteza de diluție,

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x. \quad (136)$$

Viteza de diluție reprezintă numărul de volume ale reactorului reînnoite (alimentate și evacuate) în unitatea de timp (de exemplu într-o oră). Astfel dacă $\frac{F}{V} = D = 0{,}1$, înseamnă că într-o oră s-a eliminat (și alimentat) 1/10 din volumul de lucru.

Inversul diluției are dimensiunile (timp) și poartă numele de timp de staționare sau timp de retenție hidraulică și reprezintă timpul mediu de staționare a celulelor în fermentator.

Din ecuația (136) se observă că pentru a păstra constantă concentrația biomasei $\left(\frac{dx}{dt} = 0\right)$ este suficient ca :

$$\mu = D. \quad (137)$$

Relația (127) exprimă condiția de atingere a regimului staționar. Din ecuația (136) se observă că modificarea concentrației celulelor din reactor poate fi făcută principial în două moduri :

— modificînd pe μ (chemostat) ;
— modificînd pe D (turbidistat).

Tehnica cultivării în chemostat, a cărei bază teoretică este fundamentată în lucrările lui Monod (1949), Novick şi Szilard (1950), constă în reglarea concentraţiei biomasei prin intermediul concentraţiei substratului limitativ. Scriind ecuaţia de bilanţ de masă a substratului limitativ pentru un interval mic de timp Δt, prin analogie cu (131) se obţine:

substrat alimentat + substrat existent = substrat consumat + substrat ieşit + substrat rămas (138)

Notînd cu S_0 concentraţia substratului în alimentare, cu S concentraţia lui în reactor la momentul t şi cu $(S + \Delta S)^*$ concentraţia substratului la $(t + \Delta t)$, termenii ecuaţiei anterioare devin:

— substrat alimentat $= FS_0\Delta t$;
— substrat existent $= SV$;
— substrat rămas $= (S + \Delta S)V$;
— substrat eliminat cu efluentul* $= (S + \Delta S)F\Delta t$.

Substratul consumat în reacţia biologică este proporţional cu cantitatea de celule formate. Cum cantitatea de celule formate este $(\Delta x)_c V = \mu x \Delta t V$, cantitatea de substrat consumat (datorită creşterii celulelor) este $(\Delta S)_c V = + \frac{\mu x \Delta t V}{Y_{x/s}}$, dacă ţinem seama de ecuaţia (125).

Înlocuind în (138), după reducerea termenilor asemenea şi împărţire cu $V\Delta t$, se obţine

$$DS_0 = + \frac{\mu x}{Y_{x/s}} + DS + \frac{\Delta S}{\Delta t}. \tag{139}$$

Trecînd la limită şi rearanjînd termenii ecuaţiei (139), ecuaţia de bilanţ de masă pentru substrat capătă forma:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu x}{Y_{x/s}}. \tag{140}$$

Punînd condiţia realizării regimului staţionar $\left(\frac{dS}{dt} = 0\right)$, ecuaţia (140) capătă forma:

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu x}{Y_{x/s}}. \tag{141}$$

Înlocuind pe $\mu = D$ în ecuaţia (126) se obţine valoarea concentraţiei substratului limitativ în cazul atingerii stării staţionare $(\bar{S})$:

$$\bar{S} = \frac{K_s \cdot D}{\mu_{max} - D} \tag{142}$$

Valoarea concentraţiei biomasei se obţine din ecuaţiile (141) şi (142):

$$\bar{x} = Y_{x/s}\left(S_0 - \frac{K_s D}{\mu_{max} - D}\right). \tag{143}$$

---

* *Obs.*: $\Delta S < 0$.

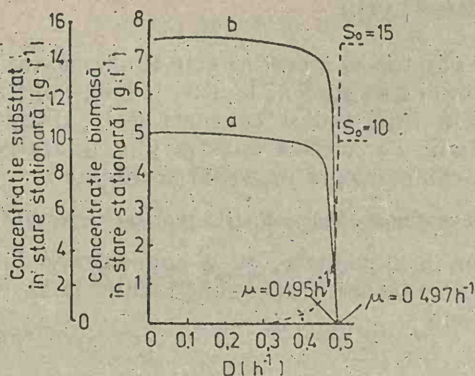


Fig. 29. Variația teoretică a concentrației biomasei, respectiv a substratului, în funcție de diluție:
$\mu_{max} = 0{,}05$ (h^{-1}); $X_{x/s} = 0{,}5$ (g/g);
a) $S_0 = 10$ (g/l), $D_{cr} = 0{,}495$ (h^{-1});
b) $S_0 = 15$,(g/l) $D_{cr} = 0{,}497$ (h^1).
(Lavric și Muntean, 1986)

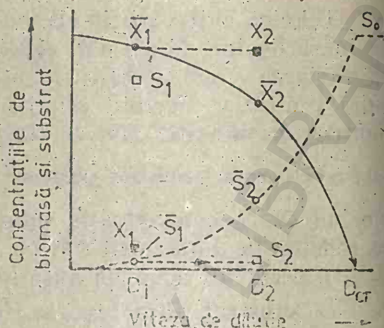


Fig. 30. Stabilirea și menținerea stării staționare în chemostat (Slater, 1979).

Reprezentînd grafic $x = f(D)$ la diverse valori ale lui S_0 se pot trage următoarele concluzii (fig. 29) (Lavric și Muntean 1986):

— la diluții mici (timpi de staționare mari) concentrația de biomasă la ieșire este practic insensibilă la variația diluției, valoarea acesteia fiind foarte apropiată de ceea maximă obținută în cazul în care tot substratul s-ar transforma în celule cu randamentul $Y_{x/s}$;

— pentru diluții mari concentrația de biomasă scade accentuat cu creșterea diluției; datorită duratelor de staționare mici, celulele nu se pot multiplica și doar o cantitate mică de substrat este consumată, așa cum se observă din fig. 30 (Slater, 1979);

— există o valoare particulară a vitezei de diluție:

$$\bar{D}_{cr} = \mu_{max} \frac{S_0}{K_s + S_0}, \qquad (144)$$

pentru care concentrația substratului din reactor este egală cu cea din influent, ceea ce înseamnă că biomasa este eliminată („spălată") din reactor [valoarea D_{cr} se obține din (143) punînd $\bar{x} = 0$]; ecuația (144) servește la determinarea lui μ_{max} în cultivare continuă;

— pe măsură ce concentrația substratului limitativ se mărește, crește și concentrația de biomasă din fermentator, dar valoarea lui D_{cr} se modifică foarte puțin.

O caracteristică specială a chemostatului este menținerea regimului staționar cu valori unice pentru x și S dacă D este fixat ($D < D_{cr}$). Să considerăm cultura crescînd cu viteza specifică $\mu = D$ la o concentrație de biomasă x_1 ($x_1 \ll \bar{x}_1$ corespunzătoare lui D_1) și o concentrație a substratului limitativ S_1 ($S_1 \gg \bar{S}_1$) (vezi fig. 30). Deoarece concentrația substratului este prea mare față de valoarea cerută pentru a asigura $\mu_1 = D_1$, el nu va mai fi limitativ, ceea ce va determină mărirea vitezei specifice de creștere a microorganismelor, la o valoare $\mu_1 > D_1$ și deci, concentrația biomasei va crește

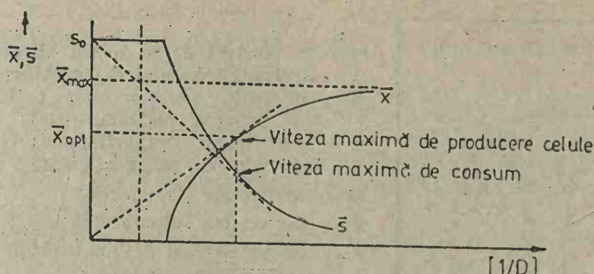


Fig. 31. Reprezentarea grafică a concentrației în funcție de timpul mediu de staționare a celulelor într-un reactor continuu (Moser, 1985).

$\left[\frac{dx}{dt} > 0 \text{ în ecuația (136)}\right]$; creșterea lui x va duce la un consum suplimentar de nutrient, deci la scăderea concentrației lui $S \frac{dS}{dt} < 0$ în (143) și implicit la limitarea vitezei specifice de creștere, ceea ce are drept rezultat scăderea lui x_1 către $\bar{x}_1$.

Se observă că la o valoare fixată a lui D, variații mici ale lui S sau x determină modificări corespunzătoare ale lui $\frac{dx}{dt}$ și $\frac{dS}{dt}$, astfel încît să se realizeze regim staționar stabil.

În unele procese de biosinteză (obținerea concentratelor proteice) se urmărește eliminarea unei cantități de biomasă cît mai mari. Fie P (productivitatea) cantitatea de biomasă extrasă din reactor în unitatea de timp (raportată la unitatea de volum):

$$P = D\bar{x} = DY_{x/s}\left\{S_0 - \frac{K_s D}{\mu_{max} - D}\right\}.\left[\frac{g}{l \times h}\right]. \tag{145}$$

Valoarea diluției (D_m) la care se obține o productivitate maximă se calculează prin derivarea relației (145) în raport cu D și anularea derivate:

$$D_m = \mu_{max}\left[1 - \left(\frac{K_s}{S_0 + K_s}\right)^{1/2}\right]. \tag{146}$$

Prin înlocuirea lui D_m în ecuația (143) se obține valoarea concentrației corespunzătoare (x_m):

$$\bar{x}_m = Y_{x/s}\{S_0 + K_s - [K_s(S_0 + K_s)]^{\frac{1}{2}}\}. \tag{147}$$

Deci, productivitatea maximă este dată de:

$$P_m = \bar{x}_m D_m = \mu_{max} Y_{x/s}\left[1 - \left(\frac{K_s}{S_0 + K_s}\right)^{\frac{1}{2}}\right]\cdot[S_0 + K_s - (K_s(S_0 + K_s))^{\frac{1}{2}}] \tag{148}$$

(fig. 31).

Abateri de la teoria chemostatului. Adesea, se observă că cinetica creșterii microorganismelor se abate de la teoria dezvoltată pe baza modelului Monod. Cîteva din abaterile tipice sînt prezentate în fig. 32 (Bull (1974)).

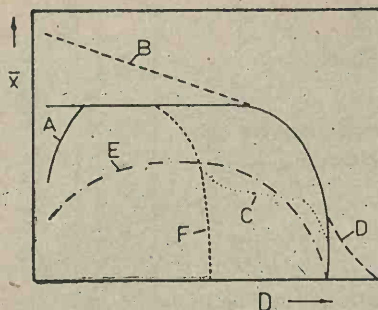


Fig. 32. Abateri de la teoria chemostatului:
A — influența energiei de menținere;
B — influența sintezei unor polimeri de rezervă (de exemplu, polizaharidele);
C — modificarea metabolismului în sensul utilizării unei căi mai puțin eficiente;
D — amestecare imperfectă;
E — toxicitatea substratului:
F — un alt element devine limitativ pentru creștere (Bull, 1974).

În cele ce urmează vor fi prezentate succint modificările ce apar datorită consumului de substrat pentru menținere, morții celulelor și amestecării imperfecte.

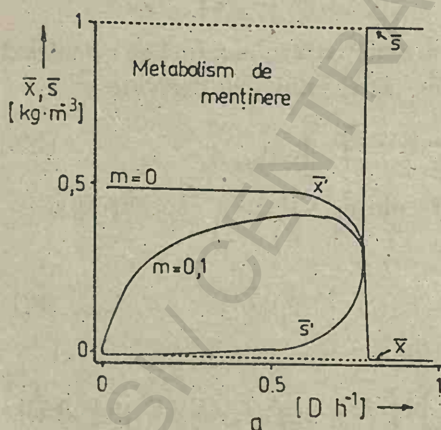
În unele cazuri s-a observat că la scăderea diluției concentrația celulelor are tendință de descreștere, așa cum se observă în fig. (33, *a* și 33, *b*), ceea ce contrazice modelul teoretic al chemostatului.

Acest comportament poate fi explicat atît prin introducerea coeficientului de menținere (m), cît și prin luarea în considerare a morții celulelor.

În tratarea teoretică a fenomenului (Sinclair și Topiwala 1970) se consideră că scăderea concentrației celulare este datorată atît pierderii de masă prin metabolism endogen cît și prin liza celulelor. În plus, se admite ipoteza simplificatoare conform căreia vitezele dispariției celulelor prin cele două mecanisme sînt proporționale cu concentrația celulelor viabile.

Deoarece, doar celulele vii consumă substratul și se multiplică, vitezele corespunzătoare vor fi:

— viteza de moarte a celulelor (egală cu cea de producere a celulelor moarte): $\mu_m x$;



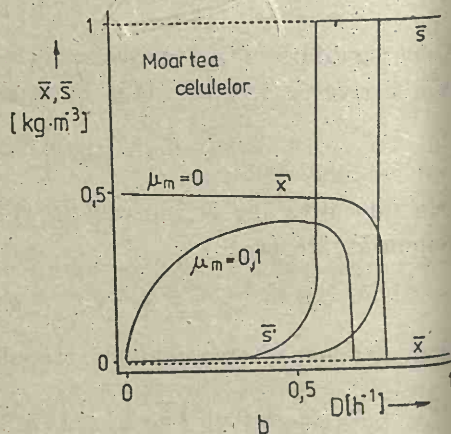


Fig. 33. *a* — Influența coeficientului de menținere asupra concentrației de biomasă și, respectiv, de substrat:
$\mu_{max} = 0,8\ (h^{-1})$, $K_s = 0,01\ (g/l)$;
$Y_{x/s} = 0,5\ (g/g)$, $S_0 = 1\ (g/l)$;
(Moser, 1985)
b — Influența „vitezei de moarte" (μ_m) a microorganismelor asupra concentrației de biomasă și, respectiv, de substrat, într-un reactor continuu cu amestecare perfectă (Moser, 1985)

— viteza metabolismului endogen : mx ;
— viteza globală (observată) de creștere a celulelor viabile : $\mu x - mx - \mu_m x$;
— viteza de consum a substratului : $\frac{\mu x}{Y_{x/s}}$,

unde cu μ_m s-a notat viteza specifică cu care celulele mor, cu m coeficientul de menținere și cu $Y_{x/s}$ randamentul de substrat maxim (în absența metabolismului endogen).

Scriind ecuațiile de bilanț de masă :
— pentru *celule viabile :*

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - mx - \mu_m x - Dx. \tag{149}$$

— pentru *celule moarte :*

$$\frac{dx'}{dt} = \mu_m x - Dx' ; \tag{150}$$

— pentru *substrat :*

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \tag{151}$$

și aplicînd ecuația M o n o d, prin anularea derivatelor, se obțin concentrațiile corespunzătoare stării staționare :

$$\bar{x} = \frac{Y_{x/s}D}{(m + \mu_m + D)}(S_0 + S) ; \tag{152}$$

$$x = \frac{\mu_m}{D}\bar{x} ; \tag{153}$$

$$S = \frac{K_s(D + m + \mu_m)}{\mu_{max} - (D + m + \mu_m)}. \tag{154}$$

Introducînd conceptul de viabilitate, exprimat ca raportul dintre numărul de celule viabile și numărul total de celule :

$$v = \frac{\bar{x}}{\bar{x} + \bar{x}'} = \frac{\bar{x}}{\bar{x}_t} = \frac{D}{D + \mu_m} \tag{155}$$

se poate determina viteza specifică de moarte a microorganismelor printr-o liniarizare a ecuației (155) :

$$\frac{1}{v} = 1 + \frac{\mu_m}{D}. \tag{156}$$

La diluții foarte mici ($D \ll \mu_{max}$) concentrația substratului în bioreactor este neglijabilă. Din ecuațiile (152) (cu $\bar{S} \simeq 0$) și (153) se obține :

$$\frac{1}{\bar{x}_t} = \frac{m}{Y_{x/s}S_0} \cdot \frac{1}{D + \mu_m} + \frac{1}{YS_0}. \tag{157}$$

Reprezentînd $\frac{1}{\bar{x}}$ funcție de $\frac{1}{\mu_m + D}$ se obține o linie dreaptă de pantă $\frac{m}{YS_0}$ și termen liber $\frac{1}{YS_0}$ (ordonată la origine).

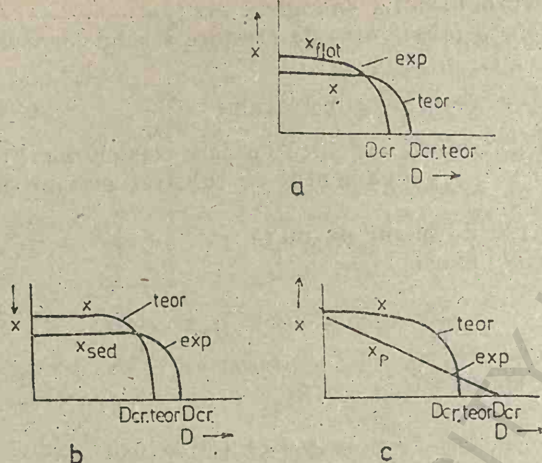


Fig. 34. Efectele amestecării imperfecte într-un reactor continuu :
a — flotația celulelor ;
b — sedimentarea celulelor ;
c — creșterea la perete (Fiechter, 1984).

Rearanjînd ecuația (154), sub forma :

$$\frac{1}{D + m + \mu_m} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_s}{\mu_{max}} + \frac{1}{\mu_{max}} D, \tag{158}$$

se pot determina K_s și μ_{max}.

Deoarece, la deducerea ecuației chemostatului am presupus că bioreactorul este perfect agitat, la scară pilot și în instalațiile industriale, determinarea vitezei specifice maxime de creștere prin intermediul diluției critice poate conduce la rezultate deosebite de cele obținute în laborator.

În fig. 34 (Fiechter 1984) sînt prezentate trei cazuri mai des întîlnite. În cazul în care eliminarea biomasei se face pe la partea superioară a vasului și în cursul procesului se formează spumă (celule și bule de aer) în cantitate mare, concentrația celulelor eliminate va fi mai mare decît concentrația medie din fermentator $\left(\frac{x}{x_f} < 1\right)$ și biomasa rămasă va fi mai diluată, deci:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - D x_f \tag{159}$$

în regim staționar $\left(\frac{dx}{dt} = 0\right)$,

$$D = \frac{\mu x}{x_f} \tag{160}$$

și $D_{cr} < D_{cr\ teoretic}$. (161)

Dacă datorită unei slabe agitări celulele sedimentează, biomasa eliminată prin partea superioară va fi mai diluată $\left(\frac{x}{x_s} > 1\right)$. Prin analogie cu

$$(160),\ D = \frac{\mu x}{x_s} \tag{162}$$

și $D_{cr} > D_{cr\ teoretic}$.

T o p i w a l a și H a m m e r (1977) au arătat că multe microorganisme pot adera la suprafețele solide cu care vin în contact și au investigat influența acestui fenomen (numit creștere la perete) asupra diluției critice.

Dacă notăm cu x_p raportul dintre masa celulelor ce aderă la perete și volumul culturii, ecuația de bilanț de masă în regim staționar conduce la:

$$Dx = \mu\bar{x} + \mu_p\bar{x}_p, \tag{163}$$

unde cu μ_p s-a notat viteza specifică de creștere a celulelor aderate la perete:

$$D = \mu + \mu_p\frac{\bar{x}_p}{x} > D_{crt} \tag{164}$$

2.3.2.3. TURBIDISTATUL

În cazul creșterii celulelor în exces de nutrienți, se poate realiza reglarea procesului pe principiul turbidistatului (Novick 1955), care permite folosirea unor diluții apropiate de diluția critică (fig. 35).

În turbidistat concentrația celulară este măsurată prin intermediul densității optice (turbidității) și reglată prin modificarea debitelor de alimentare (evacuare), deci a diluției.

Turbidistatul a fost introdus din mai multe motive. Spre deosebire de chemostat, în care creșterea este limitată de un nutrient, turbidistatul oferă posibilitatea urmăririi comportării culturii în prezența unui exces mare de nutrienți, situație utilizată la studierea comportamentului mutanților ce supraviețuiesc în prezența unor mari cantități de substanțe toxice (Moss și colab. 1967) sau a celor adaptabili la viteze mari de creștere (Bryson 1952). Pe de altă parte, operarea la diluții apropiate de D critică permite maximizarea productivității (White 1977).

Aplicarea controlului de tip turbidistat clasic la procesele în care creșterea este limitată de concentrația substratului nu asigură, însă, suficientă stabilitate stării staționare, fiind necesare modificări relativ mari ale debitelor pentru a obține menținerea concentrației.

Pentru explicarea fenomenului, să considerăm cazul în care concentrația celulară este prea mare. În această situație se vor mai mări debitele (diluțiile) pentru a se mări cantitatea de biomasă eliminată din bioreactor. Scăderea concentrației este însă micșorată de apariția unui fenomen secundar: la creșterea debitului de alimentare crește cantitatea de substrat limitativ introdus în reactor și deci concentrația acestuia se va mări. Aceasta duce la creșterea lui μ conform ecuației M o n o d.

De aceea, A n g r a w a l și L i m (1984) au propus modificarea schemei clasice a turbidistatului prin utilizarea a două alimentări în loc de una.

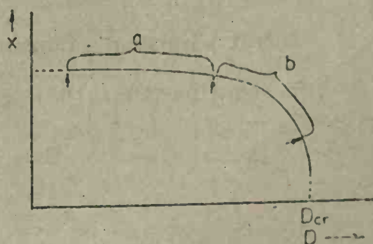


Fig. 35. Influența diluției asupra concentrației de biomasă în cultivarea continuă:
a — domeniul chemostatului;
b — domeniul turbidistatului;
(Malek și Fencl, 1966).

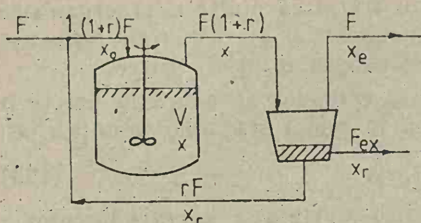


Fig. 36. Bioreactorul *R* cu recirculare.

Prima soluție conține toți nutrienții cu excepția substratului limitativ. Debitul ei, mult mai mare decît al soluției ce conține doar substratul limitativ, constituie elementul prin intermediul căruia se realizează reglarea. În acest fel se poate modifica diluția păstrînd constantă concentrația lui *S*.

2.3.2.4. BIOREACTORUL *R* CU RECIRCULARE

În cazul în care biomasa ce părăsește bioreactorul este supusă unei operații de separare, iar concentratul este parțial recirculat, există posibilitatea măririi diluției critice a procesului. Acest sistem se aplică în cazul bioproceselor ce utilizează drept materie primă o soluție în care concentrația sursei de carbon este foarte scăzută (efluenți industriali), mai ales dacă se lucrează în condiții nesterile. Ecuațiile ce guvernează procesul se bazează pe aplicarea bilanțurilor de materiale (fig. 36) (Herbert 1961, Malek și Fencl 1966, Aiba și colab. 1973, Pirt 1975).

- Pentru punctul unu

$$rFx_r = F(1+r)x_0 \tag{165}$$

- pentru separator

$$F(1+r) = F_{ex} + F_e + rF \tag{166}$$

$$F(1+r)x = F_e \cdot x_e + F_{ex}x_r + rFx_r \tag{167}$$

- pentru întregul sistem

$$F = F_{ex} + rF \tag{168}$$

- pentru bioreactor (în intervalul de timp Δt)
— bilanțul biomasei

$$rF\Delta t + xV + \mu xV\Delta t = (x + \Delta X)V + F(1+r)(x+\Delta x)\Delta t \tag{169}$$

Intrat + Existent + Generat = Rămas + Ieșit

— bilanțul substratului

$$(FS_0 + rFS)\Delta t + SV = \mu \frac{x}{Y_{x/s}} V\Delta t + (S+\Delta S)V + F(1+r)(S+\Delta S)\Delta t$$

Intrat + Existent = Consum + Rămas + Ieșit (170)

Din ecuațiile (165—168) se obține:

$$\frac{x_r}{x} = \frac{1 + r - \frac{F_e}{F} \cdot \frac{x_e}{x}}{1 + r - \frac{F_e}{F}}, \tag{171}$$

iar după prelucrarea ecuațiilor (170) și (171) în mod similar cu cea a ecuației (132) respectiv (138), rezultă :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rF}{V} \cdot \frac{x_r}{x} - \frac{F(1 + r)}{V} + \mu ; \tag{172}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_0 - S) - \mu \frac{x}{Y_{x/s}}. \tag{173}$$

Dacă notăm $D = \frac{F}{V}$ („diluție externă") și punem condiția atingerii regimului staționar, ecuațiile (172) și (173) devin :

$$\mu = D\left(1 + r - r\frac{x_r}{\bar{x}}\right) = D\left[1 - r\left(\frac{x_r}{\bar{x}} - 1\right)\right] \tag{174}$$

$$D(S_0 - \bar{S}) = \frac{\mu \bar{x}}{Y_{x/s}}. \tag{175}$$

În cazul în care $r = 0$ (nu există recirculare) se obține ecuația (137). Deoarece $r\left(\frac{x_r}{x} - 1\right)$ este subunitar, din ec. (174) se obține $\mu < D$:

$$\mu < D = \frac{\mu}{1 - r\left(\frac{x_r}{x} - 1\right)}. \tag{176}$$

um în cazul reactorului fără recirculare $D = \mu$, raportul

$$\frac{(D)_{Recirc}}{D} = \frac{1}{1 - r\left(\frac{x_r}{x} - 1\right)} \tag{177}$$

te supraunitar. Așadar folosirea recirculării permite lucrul la diluții mai mari oncentrațiile celulare sînt identice în cele două cazuri).

2.3.2.5. BIOREACTORUL CU DEPLASARE (*D*) (CURGERE TIP PISTON)

Reactorul *D* ideal (fig. 37) este caracterizat prin existența unei profil an de viteze în secțiune perpendiculară pe direcția de deplasare a fluidului xa reactorului). Existența profilului plan este o idealizare, deoarece implică istența unei amestecări radiale infinite și lipsa amestecării axiale. Deși în

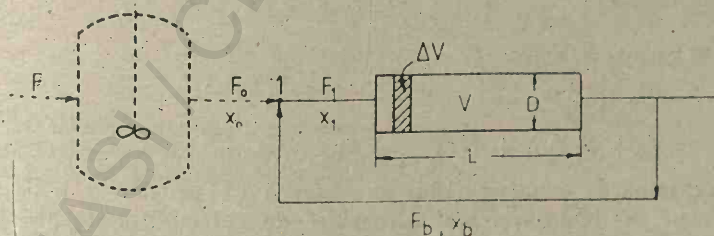


Fig. 37. Schema bioreactorului *D* ideal, cu cele două posibilități de asigurare a unei concentrații de celule (x_1) mai mare ca zero în influent :
— recircularea externă ;
— realizarea unei serii de reactoare ;
R (linie punctată) ;
D (linie continuă).

cazul reactoarelor reale profilul de viteze nu este plan, în cazul în care raportul L/D este suficient de mare, aproximația este destul de exactă. Notînd cu F_0 debitul volumetric de mediu introdus în bioreactor şi cu Fb debitul biomasei alimentate, a cărei concentrație este x_b, se poate face un bilanț al masei celulare în punctul 1 (unu) (fig. 37)

$$F_0 + F_b = F_1 \tag{178}$$

$$F_0x_0 + F_bx_b = F_1x_1. \tag{179}$$

Să considerăm că într-un interval mic de timp Δt, în reactor intră un volum de soluție (a cărei concentrație în biomasă este x_0):

$$\Delta V = F\Delta t.$$

În cazul reactorului D ideal, se poate considera că acest volum parcurge întregul reactor fără a se amesteca cu restul fluidului, comportîndu-se ca un mic reactor R, în care se dezvoltă o populație de microorganisme de la o concentrație inițială x_0. Durata procesului este egală cu timpul necesar elementului de volum ΔV pentru a traversa reactorul. Notînd cu v viteza de înaintare a frontului de fluid, cu L lungimea reactorului și cu A secțiunea lui, se pot stabili următoarele relații de legătură:

$$V = AL \tag{180}$$

$$L = vt \tag{181}$$

$$F = Av \tag{182}$$

Din relațiile de mai sus se obține:

$$t = \frac{V}{F} \tag{183}$$

unde: V este volumul întregului reactor.

În cazul în care variația densității în lungul reactorului poate fi neglijată, ținînd seama de faptul că reactorul D poate fi tratat ca o cultivare în șarjă în sistem deschis, timpul de staționare în reactor poate fi determinat cu relația (129), sau:

$$t^* = \frac{\beta_1}{\gamma\mu_m} \ln \left[\left(\frac{x}{x_1}\right)\left(\frac{x-\gamma}{x_1-\gamma}\right)^{\frac{\gamma}{\beta}} - 1\right] \tag{184}$$

dacă notăm: $x_1 + S_1Y_{x/s} = \gamma$

$$t - t_0 = t^*$$

$$x_1 + S_1Y_{x/s} + K_sY_{x/s} = \beta_1.$$

Din examinarea ecuației (184) se observă că pentru $x_1 \to 0$, $t^* \to \infty$ deci reactorul cu deplasare, spre deosebire de cel cu amestecare perfectă nu poate funcționa fără o alimentare de celule viabile. Existența unei inoculări continue face ca în reactor să existe celule la orice valoare a debitelor (cînd $D \to \infty$, $x \to x_1$).

Asigurarea inoculării continue poate fi realizată prin recircularea unei părți din biomasa extrasă după amorsarea procesului.

Scriind bilanţul de masă în punctul 1 (vezi schema din figura 37)

a) pentru celule:

$$F_0 x_0 + F_b x_b = F_1 x_1; \tag{185}$$

b) pentru substrat:

$$F_0 S_0 + F_b S = F_1 S_1; \tag{186}$$

c) bilanţ total:

$$F_0 + F_b = F_1; \tag{187}$$

şi ţinînd seama de faptul că parametrul modelului este raportul de recirculoare, definit ca

$$r = \frac{F_b}{F_0}; \tag{188}$$

se obţine:

$$x_1 = \frac{x_0 + rx}{1 + r}; \tag{189}$$

$$S_1 = S_0 - \frac{r(x - x_0)}{Y_{x/s}(1 + r)}. \tag{190}$$

Cum $(t^*)_R = \frac{V}{F_1} = \frac{V}{F_0(1 + r)} = \frac{t^*}{1 + r}$; (191)

din ecuaţiile (184) şi (191) rezultă:

$$t^* = \frac{1}{D} = (1 + r)\frac{\beta}{\alpha_1 \mu_{max}} \ln\left[\left(\frac{x}{x_1}\right)\left(\frac{x - \alpha_1}{x_1 - \alpha_1}\right)^{\frac{\alpha_1}{\beta_1} - 1}\right]. \tag{192}$$

Din ecuaţia (191) se observă că pentru $t = 0$ se obţine ecuaţia (184), iar pentru $r \to \infty$, aplicînd regula lui L' : Hospital, rezultă ecuaţia reactorului R. Din fig. 38 (Lavric şi Muntean 1986) se observă influenţa diluţiei şi a concentraţiei iniţiale a microorganismelor asupra concentraţiei biomasei la ieşirea din reactor; cu cît x_0 este mai mic, timpul de staţionare în reactor, necesar atingerii unei anumite concentraţii, va creşte. Pentru cazul în care înaintea recirculării, biomasa este concentrată de z ori $\left(z = \frac{x_r}{x}\right)$, Grieves (1964) deduce următoarea ecuaţie pentru timpul de staţionare în reactor:

$$t^* = -\frac{(1 + r)}{\mu_{max}}\left[\frac{(1 + r)K_s}{\frac{rz(S_0 - S)}{1 + r - rz} - S_0 + rS} \cdot \ln\frac{Srz}{S_0 + Sr} \cdot \ln\frac{1 + r}{rz}\right]. \tag{193}$$

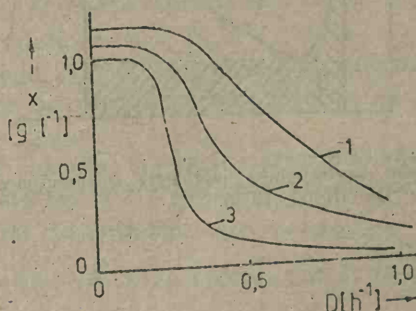


Fig. 38. Influenţa diluţiei şi a concentraţiei iniţiale a microorganismelor asupra concentraţiei de biomasă la ieşirea din reactor:
$x_0 = 0{,}1$ (g/l);
$x_2 = 0{,}05$ (g/l);
$x_3 = 0{,}01$ (g/l);
(Muntean şi Lavric, 1986).

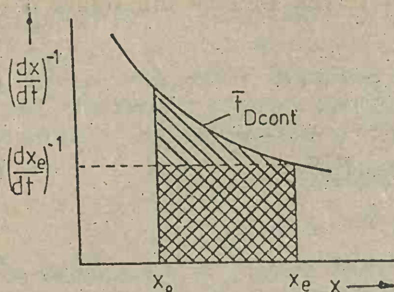


Fig. 39. Comparație între performanțele bioreactoarelor (R(\\) și D (//) în cazul reacțiilor autocatalitice; ($x_0 < x_e$) (Levenspiel, 1972).

În fig. 39 au fost reprezentați timpii de staționare în reactor pentru reactoarele R și D (Levenspiel, 1972). Se observă că pentru reacții autocatalitice (faza exponențială de creștere) reactorul R este superior reactorului D. În cazul în care se urmărește o conversie cît mai mare a substratului, este necesară luarea în considerare a fazei de creștere decelerată. Cum în general aceasta poate fi reprezentată printr-o cinetică normală, caz în care performanțele reactorului D sînt superioare celor ale reactorului R, rezultă necesitatea folosirii unei serii de reactoare $R-D$. În primul reactor se va lucra la viteze de creștere mari (conversii mici ale substratului), iar în cel de al doilea („maturare") la viteze de creștere mai mici, dar se va asigura o conversie bună a substratului. Acest sistem asigură și o inoculare continuă a reactorului D (condiție esențială pentru funcționarea sa).

Volumul minim al sistemului format din cele două reactoare poate fi determinat analitic, grafic sau numeric. În fig. 40 este reprezentată metoda grafică de determinare a volumului total minim, care constă în minimizarea ariei măsurate de sub curbă.

O altă conexiune de reactoare care poate conduce la același rezultat este formată din două reactoare R legate în serie (fig. 41); în general volumele celor două reactoare sînt dferite ($R_1 > R_2$).

Pentru determinarea concentrației la ieșirea din cel de al doilea reactor este necesară scrierea ecuațiilor de bilanț de masă pentru acest aparat, luînd în considerare atît celulele cît și substratul limitativ.

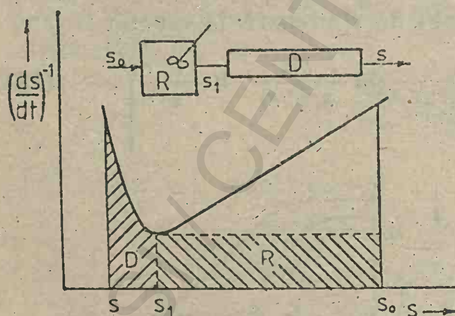


Fig. 40. Performanța unei serii de reactoare $R \cdot D$ (Levenspiel, 1972).

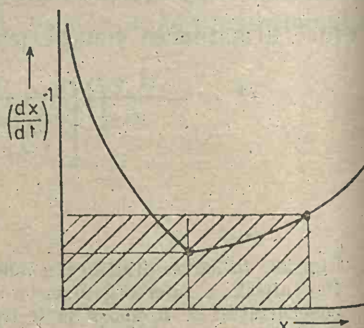


Fig. 41. Comparație între volumele bioreactoarelor necesare pentru obținerea unei anumite conversii ($x > x_{opt}$);
(\\) un singur reactor R;
(//) două reactoare R, în serie;
(Atkinson, 1974).

Pentru un interval de timp Δt acestea devin :

— bilanțul celulelor :

$$Fx_1\Delta t + x_2V_2 + \mu_2x_2V_2\Delta t = (x_2 + \Delta x_2)V_2 + F(x_2 + \Delta x_2)1\Delta t; \qquad (194)$$

Intrare + Existent + Generare = Rămas + Ieșit

— bilanțul substratului :

$$FS_1\Delta t + S_2V_2 = \frac{\mu_2x_2}{Y_{x/s}}V_2\Delta t + (S_2 + \Delta S_2)V_2 + F(S_2 + \Delta S_2)\Delta t \qquad (195)$$

Intrare + Existent = Consum + Rămas + Ieșit

:are conduc la :

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{F}{V_2}x_1 + \mu_2x_2 - \frac{F}{V_2}x_2; \qquad (196)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F}{V_2}S_1 - \frac{F}{V_2}S_2 - \frac{\mu_2x_2}{Y_{x/s}}. \qquad (197)$$

Notînd $D_2 = \frac{F}{V_2}$ și punînd condiția de regim staționar se obține :

$$x_2 = \frac{D_2x_1}{D_2 - \mu_2} \quad (198) \quad \text{și} \quad S_2 = S_1 - \frac{\mu_2x_1}{D_2 - \mu_2}\cdot\frac{1}{Y_{x/s}}. \qquad (199)$$

nlocuind valorile lui x_1 și S_1 din ecuațiile (143) și (142) în ecuația (199) și inînd seama de faptul că :

$$\mu = \mu_{max}\frac{S_1}{S_1 + K_s};$$

$$\mu_2 = \mu_{max}\frac{S_2}{S_2 + K_S} \qquad (200)$$

e obține :

$$(\mu_m - D_2)S_2^2 - \left(\mu_{max}So - \frac{K_sD_1D_2}{\mu_{max} - D_1} + K_SD_2\right)S_2 + \frac{K_s^2D_1D_2}{\mu_{max} - D_1} = 0. \qquad (201)$$

\ceastă ecuație de gradul al doilea în S_2 are două rădăcini reale : una mai nică decît S_1, iar cea de a doua mai mare. Deoarece cea de a doua soluție ıu are sens biologic (reprezentînd o transformare imaginară a celulelor în ubstrat) se va alege soluția $S_2 < S_1$

Această soluție este reprezentată grafic în figura 42.

Comparînd curbele pentru x_1 și x_2 se poate observa că :

— ambele devin zero la aceeași diluție critică D_{cr};

— pentru orice diluție mai mică decît D_{cr}, $x_1 < x_2$ și $S_2 < S_1$, deoarece ubstratul neconsumat în prima treaptă este utilizat pentru creștere în cea le a doua.

Pentru determinarea diluțiilor care conduc la maximizarea productiviății (specifice) a instalației se reprezintă grafic datele obținute într-un reactor liscontinuu sub forma $\frac{\Delta x}{\Delta t} = f(x)$ (fig. 43). În cazul în care reactoarele au ıcelași volum, cele două drepte de operare vor avea aceeași pantă, în caz ontrar, pantele fiind diferite.

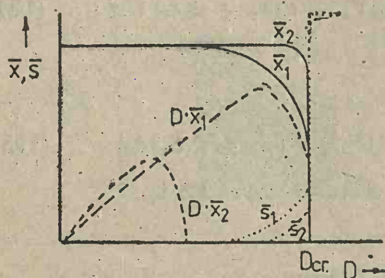


Fig. 42. Variația concentrațiilor biomasei și substratului în stare staționară pentru o serie de două reactoare cu amestecare perfectă (Herbert, 1964).

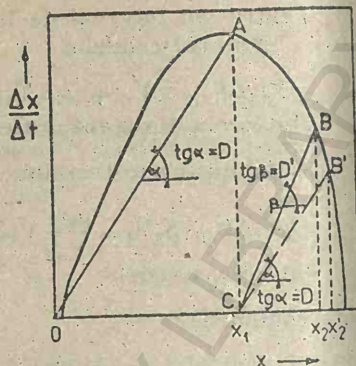


Fig. 43. Determinarea grafică a diluțiilor optime pentru un sistem de două reactoare cu amestecare perfectă în serie, în două situații: $V_1 = V_2$ (OA și CB') — același D; $V_1 \neq V_2$ (OA și CB) — $D \neq D'$.

2.3.3. ALTE TEHNICI DE CULTIVARE

2.3.3.1. CULTIVAREA ÎN ȘARJĂ CU ALIMENTARE

Această tehnică constă în alimentarea în bioreactor a unuia sau a mai multor nutrienți în timpul cultivării, fără eliminare de biomasă (Yoshida 1973). În unele lucrări (Yamane și Hirano 1977) această metodă este denumită semișarjă. E d u a r d s (1970) a utilizat o metodă de cultivare similară pentru controlul concentrației nutrientului limitativ și a denumit-o *cultură extinsă*.

Caracteristica acestui tip de cultivare constă în faptul că oferă posibilitatea controlului concentrației nutrienților prin modificarea debitului de alimentare, spre deosebire de cultivarea în șarjă clasică, în care concentrația nutrienților scade în timp, și de cea continuă în care, teoretic, concentrațiile sînt menținute constante. Deci, referindu-ne la compoziția mediului din bioreactor această tehnică se încadrează între cultivarea în șarjă și cea continuă.

În general, prin alimentarea mediului în timpul cultivării se obțin rezultate superioare comparativ cu un proces discontinuu clasic, în special în cazul în care randamentul de producere al unui metabolit este influențat de modificarea concentrației substratului limitativ.

În cazul în care se utilizează nutrienți cu proprietăți inhibitoare (metanol, etanol, acid acetic), prin menținerea concentrației acestora între anumite limite se poate obține o scurtare a *perioadei de lag* și o micșorare a efectului inhibitor.

Atunci cînd se dorește obținerea unor concentrații mari de biomasă (circa 100 g/l) sînt necesare concentrații ridicate de nutrienți, ceea ce determină apariția unui efect de inhibiție, chiar în cazul în care se utilizează un substrat ce nu manifestă un astfel de efect în concentrații mici sau moderate. Unul dintre cele mai cunoscute exemple de acest tip îl constituie așa-numita „represie catabolică" ce apare la utilizarea unor surse de carbon și energie

ușor metabolizabile (glucoză) și care constă în represia enzimelor implicate în biosinteză datorită acumulării unei cantități mari de ATP în celulă. Alimentarea treptată a glucozei poate elimina acest inconvenient. În plus posibilitatea menținerii unor concentrații mici de substrat poate fi utilizată la determinarea unor parametri cinetici cum ar fi: constantă de saturație (K_s), coeficientul de menținere (m) etc. (Esener și colab. 1981), (LEE și YAN 1981). De asemenea, este demn de reținut faptul că șarja cu alimentare poate da aceleași informații ca și o cultivare continuă, fără a fi necesară eliminarea unei părți din biomasă, controlul volumului sau modificarea stării staționare.

O trecere în revistă a bioproceselor în care este utilizată alimentarea intermitentă sau continuă a fost făcută de Whitaker (1980), iar o alta referitoare la tipurile de control al debitelor de alimentare de Yamane și Shimizu (1980).

Pentru stabilirea ecuațiilor procesului se pornește de la calcularea bilanțurilor de masă. În ipoteza că variația densității mediului în timpul procesului este neglijabilă, datorită alimentării, într-un interval mic de timp Δt, se va obține o creștere de volum ΔV.

Dacă notăm cu F debitul de alimentare a substratului, F_B debitul de alimentare al unei baze necesară reglării pH-ului, cu F_{as} debitul de antispumant și cu F_v debitul de apă pierdută prin evaporare (în cazul culturilor aerobe), variația de volum va fi dată de relația :

$$\Delta V = F\Delta t + F_B\Delta t + F_{as}\Delta t - F_v\Delta t. \tag{202}$$

În general, $F_T + F_{as} < F_v$. Cum la un debit de aer de 1vv (la $t = 30°C$, umiditate 60%)] pierderile prin evaporare sînt sub 4% (în 2 zile), suma $F_B + F_{as} - F_v$ poate fi neglijată, variația volumului fiind dată de ecuația simplificată :

$$V = F\Delta t; \quad (203) \text{ sau}$$

$$F = \frac{dV}{dt}. \quad (203')$$

Ecuația de bilanț a biomasei se calculează cu relația :

$$Vx + \mu xV = (V + \Delta V)(x + \Delta x). \tag{204}$$

Cum $\Delta V \Delta x \approx 0$, notînd $V\Delta x + x\Delta V$ cu $\Delta(Vx)$ și împărțind prin Δt se obține:

$$\mu(Vx) = \frac{\Delta(Vx)}{\Delta t}. \tag{205}$$

Pentru $\Delta t \to 0$,

$$\frac{d(Vx)}{dt} = \mu Vx. \tag{206}$$

Similar se procedează pentru substrat :

$$FS_0\Delta t + VS = \frac{\mu xV}{Y_{x/s}}\Delta t + (S + \Delta S)(V + \Delta V) \tag{207}$$

sau, după prelucrare :

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{d(Vx)}{dt}. \tag{208}$$

Notînd $\mu^* = \frac{1}{Vx}\frac{d(Vx)}{dt}$ şi $D = \frac{F}{V}$ (Pirt 1974)
obţinem

$$\frac{dx}{dt} = (\mu^* - D)x \qquad (209)$$

unde μ^* reprezintă viteza specifică de creştere (h^{-1}) corectată pentru variaţia volumului.
(Se observă că în cazul în care $v = ct$, $\mu^* = \mu$).
şi :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu}{Y_{x/s}}x. \qquad (210)$$

Ultimele două ecuaţii sînt identice (formal) cu cele obţinute pentru cultivarea continuă dar, deoarece V creşte, D nu mai este o constantă.

2.3.3.2. CULTURI SINCRONE

Prin utilizarea tehnicii cultivării continue, creşterea microorganismelor poate fi apreciată în termeni de viteză specifică de creştere sau timp de dublare. În pofida acestor avantaje performanţele individuale ale celulei nu pot fi puse în evidenţă, fiind mascate de comportamentul statistic al populaţiei, deoarece celulele se găsesc distribuite în toate fazele ciclului de creştere. Principalul avantaj al culturilor sincrone constă în faptul că toate celulele unei populaţii se află în aceeaşi stare fiziologică (în acelaşi stadiu de dezvoltare), comportamentul unei celule fiind multiplicat cu numărul de celule existente, ceea ce dă posibilitatea studierii ciclului de creştere al microorganismelor precum şi al legăturii acestuia cu metabolismul celular.

În funcţie de natura tehnicilor utilizate, se pot deosebi două categorii distincte de culturi : 1) culturile sincrone în care toate celulele se divid în acelaşi timp, deoarece la început au fost selecţionate celule cu vîrstă şi dimensiuni asemănătoare şi care nu au fost perturbate profund în tehnica utilizată pentru selecţie ; 2) culturi sincronizate care au fost aduse în acelaşi stadiu de dezvoltare, de regulă prin tratamente fizice sau chimice, care au întîrziat dezvoltarea anumitor celule (Zarnea 1984).

Von Mayenburg (1969) a utilizat pentru sincronizarea dezvoltării drojdiilor, oscilaţiile ce apar în regimul chemostatului la modificarea debitelor de alimentare. Această sincronizare durează în general 2—3 generaţii dar s-a reuşit stabilizarea ei şi pentru perioade mai lungi.

O altă metodă de sincronizare constă în adăugarea unui nutrient în pulsuri, în timpul unei cultivări continue pe un mediu în care respectivul nutrient este în cantitate foarte mică (Kjaegaard şi Joergensen 1979).

Calculul intervalului de timp dintre două adăugări ale nutrientului limitativ (glucoză, fosfat) poate fi făcut cu relaţia :

$$\frac{\ln 2}{\mu} + \left(\frac{1}{D} - \frac{1}{\mu}\right)\ln 2 = \frac{\ln 2}{D}. \qquad (2.11)$$

O altă metodă de sincronizare este cea a culturii sincron fazată (Dawson 1969, 1972). Nutrienţii se adaugă la intervale de timp egale cu un timp de dublare ales de experimentator (poate fi diferit de cel al microorganismului). După un timp de dublare, se elimină 1/2 din volumul biomasei şi se adaugă o cantitate egală de mediu de cultură.

Repetarea acestui procedeu poate menţine sincronizarea.

Cultivarea sincron fazată reprezintă o extindere a teoriei cultivării continue (ca fiind de fapt o cultură semicontinuă), permiţînd studiul sistematic al ciclului de creştere în condiţii constante (fig. 44).

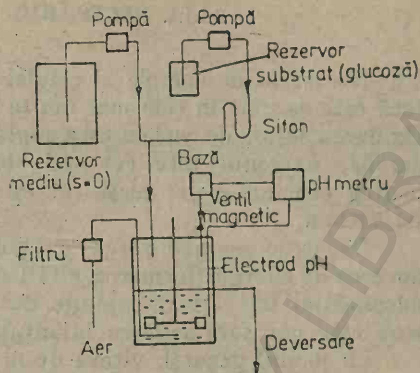


Fig. 44. Schema unei instalaţii pentru cultură sincronă (Kjaegaard şi Joergensen, 1979).

2.4. PREPARAREA MEDIILOR LA NIVEL INDUSTRIAL

Microorganismele ca toate organismele vii au nevoie pentru creştere şi multiplicare ca şi pentru celelalte manifestări ale activităţilor biologice de prezenţa în mediul înconjurător a unor substanţe nutritive care să conţină, pe de o parte, elementele chimice necesare pentru sinteza constituenţilor celulari, pentru activitatea enzimelor şi sistemelor de transport şi, pe de altă parte, să le furnizeze substanţele necesare pentru producerea de energie biologic-utilă.

2.4.1. CERINŢE NUTRITIVE

P i r t (1975) propune clasificarea nutrienţilor în patru grupe mari:
1) surse de elemente „majore" C, H, O, N;
2) surse pentru elemente minore P, K, S, Mg;
3) surse pentru asigurarea microelementelor;
4) surse de factori de creştere (de obicei vitamine).

Primul pas în definirea unui mediu de cultură a fost făcut de P a s t e u r (1896) care a introdus mediul parţial definit, alcătuit din glucoză, tartrat de amoniu şi cenuşă de drojdie, pentru creşterea drojdiilor. Rolul tartratului nu este prea clar, dar este posibil să fi contribuit la transformarea mediului, într-unul selectiv pentru drojdii, deoarece în acea perioadă nu existau alte mijloace de obţinere a unei culturi pure. Necesarul de vitamine pentru creşterea drojdiilor a fost demonstrat de W i l d i e r s (1901) care a arătat că mediul folosit de P a s t e u r a fost inadecvat pentru dezvoltarea drojdiilor. O explicaţie plauzibilă a faptului că folosind mediul amintit P a s t e u r a reuşit să obţină dezvoltarea microorganismelor ar putea-o constitui utilizarea unui inocul puternic, care conţine factori de creştere în exces (P i r t, 1975).

O altă variantă se bazează pe presupunerea existenţei unei culturi mixte, care ar fi putut să-şi sintetizeze factorii de creştere necesari.

Pentru utilizarea unui mediu la obţinerea unui anumit produs este necesară, în primul rînd, atingerea a două obiective majore:

— identificarea tuturor componentelor necesare unei creşteri echilibrate sau a celor care pot interfera cu metabolismul celular într-un mod oarecare (aspectul calitativ);

— stabilirea concentraţiei componentelor mediului (aspectul cantitativ).

2.4.1.1. NECESARUL DE CARBON ŞI ENERGIE

Necesarul de energie al celulei pentru desfăşurarea proceselor de biosinteză este asociat în cele mai multe cazuri cu utilizarea unei surse de carbon. Oxidarea sursei de carbon este cuplată cu producerea de ATP. În organismele aerobe, oxigenul este cel mai obişnuit acceptor de electroni, în timp ce pentru cele anaerobe acest rol este jucat de compuşi derivaţi de la sursa de carbon.

Deoarece metabolizarea oxigenului, utilizarea sursei de carbon şi producerea de energie (formarea ATP) sînt procese ce se corelează intim, estimarea necesarului de carbon depinde de modul de utilizare al acestuia. În acest scop este necesară scrierea bilanţului de materiale pentru carbon.

La modul general, viteza de utilizare a sursei de carbon într-o cultivare în şarjă este dată de relaţia :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}} + mx + \frac{q_p x}{Y_{p/s}}, \qquad (212)$$

în care : q_p este viteza specifică de formare a produsului (q/g·h) şi $Y_{p/s}$ randamentul de conversie al substratului în produs, ceilalţi termeni avînd semnificaţia cunoscută.

Randamentul de substrat reflectă eficienţa cu care celula poate obţine energie pentru creştere şi poate utiliza carbonul pentru biosinteza materialului celular ($Y_{x/s}$ are valori cuprinse între 0,4 şi 1,0 g s.u/g substrat sau ~1,3 g s.u./g carbon din substrat). Aşa cum s-a arătat în capitolele anterioare, randamentul de substrat nu reflectă necesarul de carbon pentru menţinere. Coeficientul de menţinere depinde de condiţiile de mediu. Astfel, în cazul drojdiei *S. cerevisiae* crescută pe gucoză în condiţii anaerobe, W a t s o n (1970) a arătat că m poate varia între 0,036 şi 0,36 (g/g·h), în funcţie de compoziţia minerală a mediului utilizat.

Dacă în cazul proceselor aerobe determinarea coeficientului de menţinere poate fi realizată relativ uşor, în cazul proceselor anaerobe este destul de dificil de distins între fracţiunea de carbon utilizată în scop energetic şi cea utilizată pentru sinteza materialului necesar. Pentru estimarea procentului de carbon utilizat la sinteza biomasei şi al celui utilizat în scopuri energetice, poate fi folosită una din următoarele metode :

— utilizarea carbonului marcat (^{14}C) pentru determinarea cantităţii de carbon încorporată în biomasă. Această metodă a fost aplicată la drojdii de K o r m a n č i č o v a (1969). Pentru *S. cerevisiae* crescută pe medii complexe, s-a determinat că procentul de carbon asimilat din glucoză a fost de 2% în condiţii anaerobe şi de 10% în condiţii aerobe. Aceste valori arată că neglijarea utilizării carbonului pentru sinteza materialului celular, în cazul creşterii pe medii complexe, nu introduce erori prea mari ;

—cea de a doua metodă se bazează pe determinarea carbonului asimilat cu ajutorul ecuaţiei :

$$\Delta S = \Delta S_c + \Delta S_e \qquad (213)$$

(substrat utilizat) = (substrat utilizat pentru creştere) + (substrat utilizat în scopuri energetice)

Împărţind prin Δx se obţine relaţia :

$$\frac{\Delta S}{\Delta x} = \frac{\Delta S_c}{\Delta x} + \frac{\Delta S_e}{\Delta x} \qquad (214)$$

sau

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{1}{Y_E}, \qquad (215)$$

Dacă notăm cu σ_c fracția de masă a carbonului din celule și cu σ_s conținutul de carbon din substrat (fracție masică):

$$\sigma_c Y_{x/s} = \sigma_s \qquad (216)$$

și

$$Y_E = \frac{Y\sigma_s}{\sigma_s \sigma_c}. \qquad (217)$$

Cea de a treia metodă, utilizabilă pentru procesele aerobe, se bazează pe stoichiometria consumării oxigenului. Se presupune că oxigenul este utilizat exclusiv ca acceptor final de electroni în procesele generatoare de energie.

Deși această ipoteză nu este întotdeauna adevărată, deoarece în unele procese oxigenul poate fi încorporat prin intermediul unei oxigenaze în compușii organici, existența unei stoichiometrii simple între consumul substratului și oxigenul încorporat (la utilizarea *n*-parafinelor este încorporat un atom de oxigen/molecula de substrat) permite determinarea oxigenului folosit ca acceptor de electroni (Harrison 1969).

Surse de carbon industriale. Cele mai utilizate surse de carbon sînt zaharurile, fie sub forma unor compuși definiți (glucoza), fie sub forma unor amestecuri complexe (melasă, hidrolizate de lemn etc.).

Glucoza este utilizată în cazul în care se urmărește obținerea unor produși cu înalt grad de puritate, în special dacă prezența substanțelor colorate, a căror înlăturare necesită operații de purificare foarte costisitoare, este nedorită. Ea se obține prin hidroliza acidă sau enzimatică a amidonului.

Melasele constituie, probabil, cea mai importantă sursă de carbon pentru industria fermentativă, fiind folosite pentru obținerea drojdiei de panificație, a celei furajere, a acetonei, butanolului, aminoacizilor.

În afară de zaharoză (~ 50%), melasa de sfeclă conține glucoză, fructoză, rafinoză, fructozil-zaharoză și galactozil-*m*-inositol. Nezaharurile (~ 30%) conțin compuși organici cu sau fără azot și compuși anorganici. Dintre compușii azotați asimilabili cel mai important component este acidul glutamic (~ 40–50%).

Au fost determinate următoarele valori ale factorilor de creștere: biotină 17,7–21,8 μg/kg, pantotenat de calciu 23–70 mg/kg, tiamină 26–75 mg/kg (T e r t y s h n y i 1981).

Deoarece compoziția melaselor este deosebit de complexă, caracterizarea calității melasei ca materie primă pentru biosinteză se face pe baza testelor biologice (tabelul 22).

Tabelul 22

Compoziția medie a melasei din sfeclă (%)
(Cura, 1983)

C	N	P	K	Mg	Ca
33	1,5–2	0,03	6	0,025	0,3

Printre compuşii a căror prezenţă nu este dorită se numără substanţele coloidale, formate din pectine şi pigmenţi caramelizaţi, atunci cînd ating concentraţii de 1,4—12,9%. Alţi contaminanţi nedoriţi sînt Pb (1—68 ppm), Cu (1,6—20 ppm), azotaţii şi azotiţii în concentraţii de 233,7—1 208,2 mg/100g, respectiv 7,3—17 mg/100 g (subst. fără zaharuri), SO_2 şi reziduuri de pesticide ppb) (Kubacki şi Kasprowicz 1972, Schiweck 1980).

În cazul în care melasele reprezintă singura sursă de carbon, ele sînt neutralizate cu $CaCO_3$, iar uneori fierte în mediu acid sau bazic pentru separarea substanţelor nedorite prin precipitare.

O altă sursă de zaharuri o constituie zerul, un subprodus al fabricilor de produse lactate. Principalul component prezent în zer este lactoza care prezintă marele avantaj al unui efect inhibitor minim, ceea ce permite folosirea ei în concentraţii mari (Demain 1970).

Trebuie menţionat faptul că la sterilizarea termică a lactozei, o parte din ea se transformă în lactuloză, compus neasimilabil.

Celuloza există în formă cristalină în pereţii celulelor vegetale alături de hemiceluloză şi lignină (raport 4 : 3 : 3). Desfacerea asociaţiilor dintre celuloză şi lignină (un polifenol) se realizează prin procedee mecanice, urmate de tratare cu abur sau iradiere cu raze γ (Datta 1981, Kamakura 1982).

Materia primă pentru obţinerea proteinelor furajere o constituie amestecul rezultat în urma hidrolizei în mediu acid, bazic sau enzimatic a deşeurilor celulozice (stuf). Microorganismele utilizate aparţin de cele mai multe ori genului *Candida* (Gonzales, Vales şi Moo-Young 1981) ca şi în cazul utilizării hidrolizatelor de lemn (Kuzneţova şi colab., 1971, Gauss şi colab., 1976) sau a leşiilor sulfitice (Balotin şi colab. 1981).

Sursele de carbon obţinute din materii prime naturale (melasă, celuloză, hidrolizate de lemn, leşii bisulfitice) prezintă o serie de dezavantaje:

—compoziţie variabilă în funcţie de anotimpul recoltării (melasă), de procedeul de fabricaţie utilizat (extracţia zahărului), de tipul lemnului folosit (hidrolizate de lemn şi leşii bisulfitice);

— prezenţa substanţelor neasimilabile sau inhibitoare (SO_2, furfurol etc.).

Deşi folosirea acestor subproduse prezintă avantajul unui preţ de cost extrem de scăzut al materiei prime, din punctul de vedere al procesului biotehnologic, fluctuaţiile de compoziţie datorate procesului de obţinere a produsului principal pun probleme deosebit de mari. Cele enumerate anterior pot fi considerate motivele principale pentru care, în ultimele decenii, s-a apelat la surse de carbon sintetice cum sînt : metanolul, etanolul, *n*-parafinele.

2.4.1.2. NECESARUL DE AZOT

Azotul este necesar în cantităţi mari deoarece reprezintă aproximativ 9% din greutatea uscată a celulei de drojdie, în care este încorporat în general sub formă redusă ca grupă $-NH_2$.

Cercetările experimentale au arătat că microorganismele sînt capabile să crească cu viteză mare şi la concentraţii mici de azot. Cele mai des utilizate surse de azot sînt amoniacul sau sărurile de amoniu, ureea şi aminoacizii. Valorile tipice ale constantei de saturaţie pentru amoniac sînt cuprinse între 0,1 şi 1,0 mg/l, iar cele pentru aminoacizi în intervalul 0,003 şi 0,2 mg/l. Aceste date reflectă eficienţa sistemelor de transport activ al celulelor pentru substanţele menţionate.

---

ppb = părţi pe bilion (1 ppb = 1×10^{-9})

Dacă satisfacerea limitei inferioare de concentrație pentru azot este, de obicei, ușor de realizat, faptul că depășirea unei concentrații de azot de 3—5 g/l poate provoca inhibiție, poate pune unele probleme.

Utilizarea ureei ca sursă de azot dă în general rezultate bune dar, în unele cazuri, înlocuirea amoniacului necesită cantități mai mari de factori de creștere, în special biotină.

Deși folosirea unor surse complexe de azot, cum ar fi extractul de porumb, hidrolizatele de drojdie sau uleiul de soia conduce la obținerea unor viteze specifice de creștere mari, prețul de cost ridicat, prezența substanțelor neasimilabile și inhibitoare precum și fluctuațiile calitative (tabelul 23) au determinat utilizarea surselor sintetice de azot pe scară tot mai largă.

Tabelul 23

Compoziția extractului de porumb
(Cejka, 1985)

Constituent (g/100 g extract de porumb)	Domeniul de valori	Valoarea medie	Abaterea medie a probei
Substanță uscată	46,80—49,60	48,47	1,71
Cenușă	8,04—10,43	8,81	0,61
Azot total	3,33—3,67	3,64	0,11
Zahăr total	4,00—4,70	4,26	0,15
(exprimat ca glucoză)	0,74—4,39	2,21	0,94
Acid lactic	11,60—19,30	13,21	1,71
Aciditate (ml. sol NaOH 0,1 N/100 g extract porumb)	108—144	125,62	8,92
Fier	0,009—0,027	0,016	0,006
Fosfor	1,5—1,9	1,72	0,098
Calciu	0,02—0,07	0,036	0,015
Zinc	0,005—0,012	0,008	0,002
Potasiu	2,0—2,5	2,25	0,143
SO_2	urme —0,02	0,07	0,003
Sedimente solide	38,4—52,9	45,1	3,50

2.4.1.3. ALTE CERINȚE NUTRITIVE

Alături de C, O, H, N creșterea microorganismelor necesită cantități relativ mari de P, S, K, Mg.

În timp ce fosforul intră în compoziția fosfolipidelor, constituind în același timp o componentă majoră a compușilor cu rol energetic (ATP), sulful este necesar biosintezei unor aminoacizi (cisteină, cistină). Metabolismul potasiului este legat de cel al fosforului, reprezentînd și un element a cărui prezență este necesară pentru consumul sursei de carbon. Magneziul prezintă un factor stimulator al activității decarboxilazelor și fosfat-transferazelor.

Alături de elementele menționate, în structura unui mediu de creștere intră și alți ioni metalici, necesari în cantități mai reduse, motiv pentru care aceste elemente sînt denumite microelemente. Din grupul microelementelor esențiale pentru creștere fac parte Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, iar uneori B, Na, Al, Si, Cl, I, V, Cr, Ni, Mo, Sn etc.

Deși calciul nu pare esențial pentru creșterea microorganismelor, el stimulează creșterea în concentrații mici, în concentrații mari avînd un efect slab inhibitor.

Fierul reprezintă un cofactor al enzimelor cu funcții redox. Cuprul participă la lanțul respirator al drojdiilor. Zincul este necesar deoarece ADN și ARN-ploimerazele sînt metaloproteine cu Zn (Zarnea 1984).

În timp ce necesarul de macroelemente este ușor de evidențiat, chiar în cazul ionilor metalici (K^+, Mg^{2+}) care trebuie introduși în mod obligatoriu în mediu, influența Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} etc. este greu de demonstrat, deoarece pe de o parte concentrațiile lor scăzute măresc foarte mult dificultățile legate de determinarea lor, iar pe de altă parte există posibilitatea prezenței lor ca agenți contaminanți din apa și sărurile folosite în prepararea mediului de cultură.

Necesarul de ioni minerali variază calitativ și cantitativ de la un microorganism la altul, în primul rînd datorită diferențelor de constituție enzimatică și de eficacitate a mecanismelor de concentrare activă a lor din mediu. În plus, unii factori de mediu pot contribui la această variabilitate. Un exemplu în acest sens îl constituie nevoia concretă de potasiu a unor microorganisme, în prezența unui exces de sodiu, fapt ce reflectă prezența, în celulele respective, a mai multor enzime care nu sînt active decît în prezența K^+, în timp ce ionii de Na^+ acționează ca un inhibitor competitiv (Zarnea 1984).

O tratare mai amănunțită a cerințelor nutritive ale microorganismelor poate fi găsită în lucrările autorilor Soumalainen și Oura (1971), Zarnea (1988) precum și în Capitolul 3 din volumul 1.

2.4.2. PROIECTAREA ȘI OPTIMIZAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Zarnea și colab. (1980) consideră că un mediu de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv sterilizat, care permite dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. Ei utilizează mai multe criterii de clasificare:

— consistență: (medii lichide, solide, semisolide);

— tipul respirator al microorganismelor cultivate (medii pentru microorganisme aerobe și anaerobe);

— scopul și frecvența întrebuințării (medii de uz curent și medii speciale de izolare care pot fi la rîndul lor elective, selective, de îmbogățire, de conservare și de identificare);

— după compoziție (medii naturale, sintetice).

În cele ce urmează ne vom referi numai la mediile de uz curent, lichide.

Fiechter (1981, 1984) arată că proiectarea sistematică a mediilor de cultură poate fi făcută în șase etape.

Etapa 1. **Selecția componentelor și a formei în care acestea sînt prezente în mediu.**

Pentru estimarea macroelementelor necesare dezvoltării microorganismelor pot fi utilizate datele prezentate în literatură referitoare la necesitățile nutriționale ale microorganismelor (vol 1, capitolul 3). Deși în lucrările de specialitate sînt prezentate și rețete de mediu, utilizarea acestor rețete trebuie făcută cu multă prudență. Pe de o parte rețetele de medii industriale reprezintă secrete de fabricație, iar pe de altă parte rețetele prezentate în diverse articole diferă foarte mult de la un autor la altul. Pentru demonstrarea

afirmației de mai sus în tabelul 24 sînt prezentate cîteva rețete de medii utilizate pentru obținerea de biomasă din *n*-parafine. Pentru calculul necesarului de macroelemente se poate folosi comparația elementară a biomasei uscate.

Tabelul 24

Compozițiile unor medii de cultură (macroelemente) pentru obținerea biomasei din *n*-parafină cu tulpini din genul *Candida*

Componentul	Concentrații (g/l)								
	Cjekova 1970	Champagnat 1974	Prokop 1971	Yoshida 1971	Kretschener 1980	Mauersberger 1980	Moo-Young 1970	Anghelache 1978	Wagner 1969
n-parafina	10					~5–10		10	15
KCl		5,75							
K_2HPO_4			7,0					20	
KH_2PO_4	7			5,0	1,5	1	7,0	20	5,5
NH_4	0,4								
NH_4Cl			5,0	5,0					
$(NH_4)_2SO_4$					2,0	3,0	4,0	10	
$(NH_4)_2HPO_4$		10			2,0				8,0
NH_4NO_3								10	
Na_2HPO_4					0,399		0,48		0,6
uree	0,4								
$MgSO_4$			0,195	1,92	0,073	0,34	0,09	0,48	0,048

F i e c h t e r (1981) propune combinația de macroelemente corespunzătoare la 100 g glucoză, prezentată în tabelele 25 și 26.

Tabelul 25

Combinație de macroelemente ce corespund la 100 g glucoză
(Fiechter, 1981)

Element	Cantitatea (g)	Sub formă de
N	5,6	$(NH_4)_2SO_4$; $(NH_4)_2HPO_4$
P	1,5	$(NH_4)_2HPO_4$
K	1,52	KCl
Mg	0,148	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$

Tabelul 26

Exemplu de mediu semisintetic cu limitare de carbon
(Fiechter, 1984)

$(NH_4)_2SO_4$	2 g	$MnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	3,5 mg
$(NH_4)_2HPO_4$	0,64 g	Biotină	0,01 mg
KCl	0,29 g	*m*-Inozitol	20 mg
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,15 g	Pantotenat de Ca	10 mg
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	0,14 g	Tiamină	2 mg
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0,78 g	Piridoxină	0,5 mg
$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	4,8 mg	Extract de drojdie	0,25 g
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$		Glucoză	100 g

Deoarece informațiile despre natura și mai ales cantitatea microelementelor necesare unei creșteri echilibrate sînt destul de contradictorii (vezi de exemplu Soumalainen și Oura 1971), este necesară testarea necesarului de microelemente. Pentru estimarea cantităților necesare se pot utiliza datele compoziției chimice a cenușii microorganismelor. Compoziția cenușii drojdiilor este dată în tabelul 27.

Tabelul 27

Elemente minerale din compoziția biomasei uscate
(Fiechter, 1981)

Element	Concentrație (g/100 g s.u.)
P	0,8–2,6
S	0,01–0,24
K	1,0–4,0
Mg	0,1–0,5
Na	0,01–0,1
Ca	0,1–0,3
Fe	0,01–0,5
Cu	0,02–0,01
Mn	0,002–0,01
Mo	0,0001–0,0002

Necesitatea existenței unor metale în mediul de creștere poate fi determinată uneori indirect. Astfel în cazul microorganismelor ce produc cantități mari de vitamină B12 este posibilă existența unei cerințe de Co^{2+}.

Nici în ceea ce privește necesarul de factori de creștere, datele din literatură nu oferă informații complete. De multe ori se preferă adăugarea unor compuși naturali (extract de drojdie, extract de porumb) fără a se cunoaște exact ce factor de creștere este esențial pentru dezvoltarea microorganismelor.

Etapa a 2-a. **Prepararea mediului**

Cea mai mare problemă la prepararea mediilor, mai ales în condiții industriale, o reprezintă formarea precipitatelor. De aceea este absolut necesar ca în rețetele de preparare a mediilor să se specifice nu numai cantitățile ci și ordinea de adăugare a sărurilor. Ideală ar fi alimentarea separată a surselor de fosfor, magneziu și fier, dar această metodă este foarte costisitoare. Utilizarea unui *p*H scăzut sau a agenților chelanți (acidul citric pentru legarea fierului, histidina și alți aminoacizi dînd rezultate mai slabe).

O altă problemă ce apare la prepararea mediilor o constituie degradarea la sterilizarea termică a unor compuși (vitaminele). Pentru acestea, este preferabilă dizolvarea în cantități mici de apă și sterilizarea prin filtrare.

Din păcate nu pot fi făcute recomandări la procedura optimă de preparare a mediului, aceasta depinzînd de caracteristicile fiecărui bioproces în parte.

Etapa a 3-a. **Diagrama preliminară $x = f(D)$**

O procedură foarte eficace pentru încercarea mediului este chemostatul cu limitare de carbon. Reprezentarea concentrației biomasei și a substratului funcție de diluție ne arată dacă cinetica creșterii urmează sau nu modelul Monod. Estimarea parametrilor de creștere (Y, μ_m, K_s) ne poate oferi informații utile. Din aceste date se observă dacă mediul respectiv oferă posibilități optime de creștere.

Etapa a 4-a. **Determinarea constantelor de saturare și inhibiție pentru sursa de carbon**

Pentru aceasta se variază concentrația sursei de carbon, efectuîndu-se mai multe cultivări în sistem discontinuu.

În cazul în care se obțin valori prea mari ale constantei de saturație, pot fi luate în considerare următoarele cauze :

— substrat greu degradabil ;

— existența unui inhibitor (inhibiție de substrat sau produs) ;

— distribuție imperfectă (creștere la perete, agitare slabă, spumare prea puternică) ;

— limitări necunoscute.

Etapa a 5-a. **Optimizarea mediului**

Pentru aceasta se utilizează cultivarea în chemostat. T s u c h i y a și colab. (1980) au utilizat metoda chemostatului pentru optimizarea mediului necesar dezvoltării unui microorganism metilotrof la o viteză de diluție de 0,1 h^{-1}, utilizînd ca substrat limitativ, metanolul. Au fost estimate cantitățile optime de NH_4^+, PO_4^{3-} și Mg^{2+} din valorile concentrației minime de săruri la care a apărut limitarea de carbon (fig. 45). În același mod s-au stabilit și concentrațiile optime de Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} și Zn^{2+}. În figura 45 sînt reprezentate datele utilizate la optimizarea concentrațiilor de NH_4^+. După

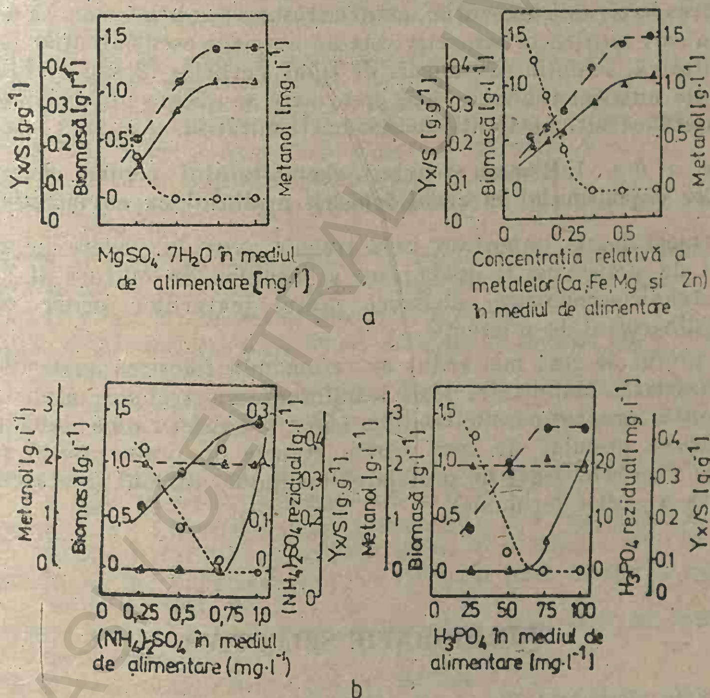


Fig. 45. Exemple de optimizare a unui mediu de cultură în care substratul limitativ este metanolul, folosind tehnica chemostatului ($D = 0,1\ h^{-1}$) ;
— metanol ; ● — biomasă ; Δ — randament Y_x/CH_3OH ;
(Tsuchiya, 1980).

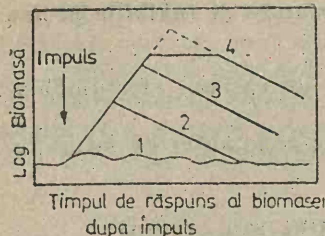


Fig. 46. Optimizarea mediului de cultură prin utilizarea unui semnal de tip impuls (Fiechter, 1980):
curba 1 — substanță fără efect semnificativ asupra creșterii;
curbele 2, 3 — efecte de creștere reale (substratul respectiv este limitativ);
curba 4 — concentrație prea mare de substrat (efect inhibitor).

stabilirea concentrației estimative de $(NH_4)_2SO_4$ s-au făcut 4 cultivări la o diluție de 0,1 h^{-1}, singura diferență fiind concentrația de $(NH_4)_2SO_4$ (0,25—0,5—0,75—1 g/l). Este de așteptat ca la concentrații mici de NH_4^+, acest ion să devină factorul limitativ. Cea mai mică valoare la care apare limitarea prin carbon reprezintă concentrația optimă a acestui nutrient.

O metodă mai elegantă, care nu necesită 4 cultivări ci doar una singură, constă în modificarea (în timpul cultivării) a concentrației nutrientului cercetat. Modificarea poate fi făcută în două moduri:

— printr-un semnal de tip treaptă (shift);

— printr-un semnal tip impuls (pulse).

(În ambele tehnici diluția se menține constantă).

În figura 46 este prezentată modificarea concentrației biomasei la mărirea printr-un semnal tip impuls a concentrației unui nutrient. În cazul în care nutrientul respectiv este neesențial, pentru creștere se obține o curbă de tipul *1*. În cazul în care nutrientul respectiv este un nutrient esențial, aflat în concentrație limitativă, se obțin răspunsuri de tipul curbelor *2* sau *3*. În cazul în care doza de nutrient limitativ este prea mare se obține un palier (curba *4*) care ne arată că alți nutrienți au devenit limitativi.

Etapa a 6-a. **Utilizarea tehnicii chemostatului pentru determinarea constantelor organismului în cazul folosirii mediului cu compoziție optimă**

Un aspect foarte important care trebuie avut în vedere pe parcursul procedurii de proiectare și optimizare a mediilor de cultură îl constituie cerințele tehnico-economice, deoarece prețul materiilor prime reprezintă 10—60% din costul de producție.

Deși prețul de cost mai redus ar recomanda folosirea materiilor prime naturale (melasă, hidrolizate, leșii bisulfitice), nu trebuie uitat faptul că acestea conțin produși neasimilabili, a căror prezență ridică două probleme mari: mărirea prețului de cost pentru etapele de prelucrare și purificare a biomasei și al celui legat de protejarea mediului ambiant (tratarea termică și biologică a apelor reziduale).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AIBA S. În: Biotechnol. Bioeng. *10*, 1968, 845.
2. AIBA S., HUMPHREY A. E. și MILLIS N. F. *Biochemical Engineering*, Academic Press, 1973, New York, 1973.
3. ANGRAWAL P, și L.M HIC. În: Advs. in Biochem. Eng./Biotechnol., *30*, 1984, 61
4. ANONYMOUS. În: Chem. Eng., *82*, 1975, 87.

5. BABEL W. şi colab. Patent R.D.G. nr. 139870, 1980.
6. BATTLEY E. H. În: Physiol. Plant, *13*, 1960, 628.
7. BAZNA C. D. şi WILKE C. R. În: Biotechnol. Bioeng Symp. 7, 1977, 10.
8. BEQUE W. J. şi LICHTEINSTEIN, H. C. În: Proc. Soc. exp. Biol. Med., *114*, 1963, 625.
9. BERGTER F. şi KNORRE W. În: Z. Allg. *Mikrobiol.* *12*, 1972, 613.
10. BIROU B., MARISON W. IAN şi von STOCKAR URS. În: *Biotechnol.* Bioeng. *30*, 1987, 650.
11. BLACKMANN F. F. În: Ann. Bot., *19*, 1905, 281.
12. BLAKEBROUGH W. *Biochemical and Biological Engineering ,Science*, vol. 1 (şi 2), Academic Press, New York, London, 1967 (1968).
13. BOLOTIN D. B. şi colab. Patent U.R.S.S. nr. 722638, 1981.
14. BROCK T. D. În: Science, *158*, 1967, 1012.
15. BRYSON V. În: Science, *116*, 1952, 48.
16. BULL A. T. *„Microbiol Growth“ in „Companion to Biochemysty“*, ed. Bull, A.T., Lagnado, J.R., Thomas, J.O. şi Tipton, K.F.
17. LONGMAN, London, 1974.
18. BULL A. T., BUSHELL T. G. şi SLATER, J. H. În: Proc. Soc. Gen. Microbiol., *3*, 1975, 62–63.
19. BUTTON D. K. şi GARVER I. C. În: J. Gen. Microbiol., *45*, 1966, 195.
20. CAMA F. J. şi EDWARDS V. H. În: J. Ferment. Tehnol, *48*, 1970, 787.
21. CARDINI G., DI FIORE, L. şi ZOTTI A. În: „Abstr. 5th Int. Ferment. Symp.“, Berlin, 1976, 202.
22. CEJKA A., Patent R.S.C. 135820 (1970).
23. CEJKA A. În: Biotechnology, editori Rehm, H. J. şi Reed, G, vol. 2, Verlag Chemie, 1985, 631.
24. CONTOIS D. E. În: J. Gen. Microbiol., *21*, 1959, 40.
25. COONEY C. L., WANG D. I. C. şi MATELES, R. I. În: Biotechnol Bioeng., 11, 1969 269.
26. COONEY C. L. În: Proc. Biochem., *14*, 1975, 5.
27. COONEY L. În: Biotechnology, editori Rehm, H. J. şi Reed, G, vol. 1, Verlag Chemie, Berlin, 1981.
28. CORDIER J. L. În: Appl. Microbiol Biotechnol., *25*, 1987, 305.
29. DATTA R. În: Process Biochem, *16*, 1981, 42.
30. DAVISON M. J., DOWNIE J. A. şi GARLAND P. B. În: Biochem. J *129*, 1972, 46P.
31. DAWSON P. P. S. şi KURTZ W. În: Biotechnol. Bioeng., *11*, 1969, 810.
32. DAWSON P. P. S. În: J. Appl. Chem. Biotechnol., *22*, 1972, 79.
33. DEMAIN A. L. În: J. Appl. Chem. Biotechnol., *22*, 1972, 345.
34. DEMAIN A. L., KENNEL V. M. şi AHARONOWITZ, Y. În: Symp. Soc. Gen. Microbil, *29*, 1979, 163.
35. DIXON M. şi WEBB E. C. *Enzymes*, ed. a 2-a, Longmans, London, 1967.
36. DONACHIE W. D. şi BEGG K. J. În: Nature, *227*, 1970, 1220–1224.
37. EDWARDS V. H. În: Biotechnol Bioeng. 7, 1970, 975.
38. EINSELE A. În: Biotechnology, editori Rehm, H. J. şi Reed, vol. 3, Verlag, Chemie Berlin, 1983, 631.
39. EISENTHAL R. şi CORNISH-BOWDEN A. În: Biochem. J., *139*, 1974, 715.
40. ERICKSON L. E., VIESTURS U. E. şi SELGA S. E. În: Biotechnol. Bioeng, *20*, 1978, 1623.
41. ESENER A. A., ROELS, J. A., KOSSEN, N. W. F. şi ROOZENBURG, J. W. A. În: Eur J. Appl. Microbiol. Biotechnol. *13*, 1981, 14.
42. FEDOROO V. V., KATRUSH R. V., VOROB'EVA G. I., GARBALINSKII V. A. şi BELOGORTSEV Y. A. În: Khim Feknol. Topl. Mosel, *5*, 1981, 32.
43. FIECHTER A. În: Biotechnology, Rehm. H. J. şi Reed, G, editori, Verlag Chemie, Weinheim, 1981, 453.
44. FIECHTER A. În: „Advances in Biochem. Eng. / Biotechnol“, 30, Springer-Verlag, Berlin, 1984, 7.
45. GAUSS W. F. şi colab., Patent S.U.A. nr. 3990944, 1776.
46. GERHARDT P. şi BARLETT M. C. În: Advs. i n Appl Microbiol., *1*, 1959, 215.
47. GIURCĂ R., MIHAIL R., STRAJA S., NICULESCU S., BAY E., ARSENE M.,
48. GHERGHEAŢĂ E şi STIHI A. În: Revistă de chimie, 7, 1987, 598.
49. GOLDBERG I. şi ER-EL. Z. În: Process. Biochem., *16*, 1981, 2.
50. GONZALES-VALDES A. şi MOO-YOUNG M. În: Biotechnol Lett. *3*, 1981, 143.

51. GRIEVES R. B., PIPES W. O., MILBURY W. F. şi WOOD R. K. În: J. Appl. Chem., 14, 1964, 478.
52. HAN K. şi LEVENSPIEL O. În: Biotechnol. Bioeng, *32*, 1988, 430.
53. HARRISON D. E., MACLENNON D. G. şi PIRT, S. J. În: Fermentation Advances Academic Press, New-Yorkl 1969, 117.
54. HERBERT D. În: A theoretical analysis of continuous culture systems. Symposium on continuous culture of microorganisms-1960, London, publicat 1961.
55. HERBERT D. În: Continuous Culture, Monography, 12, Society of Chemistry and Industry, London, 1961, 21.
56. HERBERT D. În: Proc. Symp. Contin. Cult. Microorganisms. Czechoslovak Academy of Sciences, Praga, 1964, 23.
57. HINSELWOOD C. N. *The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell*, Clarendon Press, Oxford 1946.
58. HINSELWOOD C. N. Decline and Death of bacterial populations, În: „Nature", *161*, 1951, 666.
59. HUMPHREY A. E., A.C.S. Symp. Ser., 1978, 22.
60. HUNTER K. şi ROSE, A. H. În: J. Appl. Chem. Biotechnol., *22*, 1972, 527.
61. HUSTEDE H. şi SIEBERT, D. Patent S.U.A. 3843465, 1974.
62. HUTNER S H. În: Ann. Rev. Microbiol., *26*, 1972, 113.
63. JAQUES I. A. În: Math. Biosci., 1970.
64. JACKSON J. V. şi EDWARDS, V. H. În: Biotechnol. Bioeng., *17*, 1975, 943.
65. JOHNSON H. J. În: Chem. Ind., sept., 1964, 1953.
66. JOHNSON M. J. În: J. Bacteriol., *94*, 1967, 101.
66. JOHNSON M. J. În: J. Bacteriol., *94*, 1967, 101.
67. KAMAKURA M. şi KAETSU I. În: Biotechnol. Bioeng., *24*, 1982, 991.
68. KJAEGAARD L. şi JOERGENSEN B. B. În: Biotechnol, Bioeng., *22*, 1972, 79.
69. KNECHT R., PRAVE P., SEIPENBUSCH R şi SUKATSCH D.A. În: Process. Biochem., *12*, 1977, 11.
70. KONO T. şi ASAI T. În: Biotechnol. Bioeng., *11*, 1969, 19.
71. KONO T. şi ASAI T. În: Biotechnol. Bioeng, *11*, 1969, 293.
72. KORMANCIKOVA V., KOVAC L. şi VIDOVA, M. În: Biochim, biophys. Acta., *180*, 1969, 9.
73. KRIEGER J. În: Chem. Ind., London, August 1, 1983, 21.
74. KUBACKI S. şi KASPROWICZ W. În: Prace. Insto. Lab. Bad. Przemysl. Spoz. *2*, 1972, 295.
75. KUZNETSOVA V. I. şi colab. Patent U.R.S.S., nr. 311956, 1971.
76. LAMANA C. şi MALLETTE M. F. *Basic Bacteriology*, Oxford-Press, London, 1959.
77. LANGMUIR I. În: J. Am. Chem. Soc, 40, 1918, 1361.
78. LAVRIC V. şi MUNTEAN O. În: Bul. Instit. Polit. Buc., *48*, 1986, 15.
79. LEE, H. H. şi YAN B. D. În: Chem. Eng. Sci., *36*, 1981, 483.
80. LEVENSPIEL O. *Chemical Reaction Engineering*, John Wiley, New-York, 1972.
81. LEVENSPIEL O. În: Biotechnol. Bioeng. *22*, 1980, 1671.
82. LINEWEAVER H. şi BURK, D. În: J. Am. Chem. Soc., *40*, 1918, 1361.
83. LUEDEKING R. şi PIRET E. L. În: J biochem. microbiol. Tech. Eng. *1*, 1959, 393.
84. MALEK I. şi FENCL Z. *Theoretical and Methodological basis of continuous culture of microorganisms*, Ed. Academiei Praga, 1966.
85. MARR, A. G. şi INGRAHAM J. L. În: J. Bact., *34*, 1962, 1260.
86. MATELES R. J. În: Biotechnol. Bioeng., *13*, 1971, 581.
87. MATELES R. J. şi BATTAT, E. În: Appl. Microbiol., *28*, 1974, 901.
88. MAYENBURG von K. În: Vierteljahriesschr Naturfosch. Ges. Zurich, *114*, 1969, 113.
89. MIDDELHOVEN W. J. În: J. Gen. Microbiol., *93*, 1976, 1985.
90. MINKEVICH I. G. şi EROSHIN V. K. În: Folia Mikrobiol, *18*, 1973, 376.
91. MIHAIL R. şi MUNTEAN O. *Reactoare chimice*, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1984.
92. MIHAIL R., MUNTEAN O. şi LAVRIC V., *Ingineria proceselor biochimice*, Bucureşti 1988.
93. MONOD J. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes*, Herman Cie, Paris, 1942.
94. MONOD J. În: Ann. Rev. Microbiol., *3*, 1949, 371.

95. MORR J. R. și FIECHTER A. În: Biotechnol. Bioeng, *10*, 1968, 159.
96. MOSER A. *Biotechnology*, vol. 2, Verlag Chemie-Weinheim, 1985.
97. MOSS F. J. și BUSH F. E. În: Biotechnol. Boieng., 9, 1967, 585.
98. MURGULESCU I. G. și VILEN R. *Introducere în chimia fizică*, ed. Acad. R.S.R., vol. III, 1982.
99. NAGAI S. În: Advs. Biochem. Eng. *11*, 1979, 53.
100. NOAK D. *Biophysikal. Prinzipen der Populationsdynamic in der Mikrobiologie*, VEB G Thieme, Leipzig, 1968.
101. NOVICK A. și SZILARD, L. În: Proc. Natl. Acad. Sci. Washington, *36*, 1950, 708.
102. NOVICK A. În: Ann. Rev. Microbiol., *9*, 1955, 97.
103. OKUNUKI K. *Fermentation chemistry*, Kyoritsu Shuppan, Tokio, 1951.
104. OLBRICH H. În: *Principles of Sugar Technology* vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1963, 511.
105. ONISCU C. *Tehnologia produselor de biosinteză*, Editura Tehnică, București, 1978.
106. PASTEUR L. În: Annales de Chimie et de Physique, 3e Serie, *58*, 1896, 324.
107. PAYNE W. J. În: Ann. Rev. Microbiol., *24*, 1970, 17.
108. PERINGER P. În: Biotechnol. Bioeng Symp., *4*, 1973, 27.
109. PERRET C. J. În: J. Gen. Microbiol., *22*, 1960, 589.
110. PILAT P. și PROKOP A. În: Biotechnol. Bioeng., 17, 1975, 1717.
111. PIRT S. J. În: Proc. Roy. Soc. B., *163*, 1965, 224.
112. PIRT S. J. și KURONOSCHI V. M. În: J. Gen. Microbiol., 63, 1970, 357.
113. PIRT S. J. În: J. Appl. Chem. Biotechnol., *24*, 1974, 415.
114. PIRT S. J. *Principles of microbe and cell cultivation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.
115. POWELL E. O. În: J. Gen. Microbiol., *15*, 1956, 492.
116. POWELL E. O. În: „Microbial Physiology and Continuous Culture", Speke, Liverpool, 1967, 34.
117. PROCHAZKA G. J. În: Biotechnol. Bioeng., *15*, 1973, 1007.
118. REHM H. J. „*Industrielle Mikrobiologie*", Springer Verlag, Berlin, 1980.
119. REUSS M. În: Eur. J. Appl. Microbiol., 1, 1975, 295.
120. ROELS J. A. În: Biotechnol. Bioeng., *22*, 1980, 2457.
121. ROHR. În: Biotechnology, vol. 2.
122. SCHIWECK H. În: „Proceeding Problem with Molasses in the Yeast Industry", Helsinki, 1980, 21.
123. SCRIBAN R. Biotechnologie, ed. 2a, CEDEX, Paris, 1984.
124. SIMON P. și MEUNIER R. „*Microbiologie Industrielle et genie biochimique*", Masson Paris, 1970.
125. SINCLAIR C. G. și RYDER D. N. În: Biotechnol. Bioeng., *17*, 1975, 375.
126. SINCLAIR C. G. și TOPIWALA H. H. În: Biotechnol. Bioeng., *12*, 1069.
127. SLATER J. H. În: „Microbiol. Ecology: A Conceptual Approach", Blackwell, Oxford 1979.
128. SLATER J. H. În: „Genetic and Biological Fundamentals", Academic Press Londra, vol. 2, 1984.
129. SNEDECOR B. și COONEY C. L. În: Appl. Microbiol., *27*, 1974, 1112.
130. SPERBER El În: Arkiv. Kemi. Mineral. Geol., 21, A nr. 3, 1945.
131. STEEL, R. „*Biochemical Engineering*", Academic Press, Londra, 1958.
132. SUOMALAINEN H. și OURA E. „*Yeast Nutrition and Solute Uptake*" În: „*The Yeasts*" (Rose A. H. și Harrison J.S., editori) Londra, 1971, 3.
133. TANI Y. În: Adv. Appl. Microbiol., *24*, 1978, 165.
134. TEISSIER G. În: Ann. Physiol. Physiokhim. Biol., *12*, 1936, 527.
135. TERTYSHNYI V. N., KRASNOBRIZHU N. Y., POLOTNYAK A. D. și BALABUSHEVICH, M.I. În: Microbiol. Zh. Kiev, *43*, 316.
136. TOPIWALA H. H. și HAMER G. În: Biotechnol. Bioeng. 13, 1971, 919.
137. TOPIWALA H. H. În: Biotechnol. Bioeng. Symp., 4, 1973, 681.
138. TSUCHIYA Y., NISHIO N. și NAGAI S. În: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9 nr. 2, 1980, 121.
139. VAN UDEN N. În: Arch. Microbiol., *58*, 1967, 155.
140. VAN UDE M. În: „Continuous Cultivations of Microorganisms"-Symp., Academia din Praga, 1969, 49.

141. VAN UDEN M. și MADEIRA-LOPES A. În: Biotechnol. Bioeng., *18*, 1976, 791.
142. WATSON T. G. În: J. Gen. Microbiol., *64*, 1970, 91.
143. WAYMANN M. și TSENG M. C. În: Biotechnol. Bioeng, 18, 1976, 383.
144. WEBB J. L. „*Enzyme and Metabolic Inhibitors*", vol. 1, Academic Press, New York, 1963.
145. WHITAKER A. În: Proces Biochem. 15, apr-mai, 1980, 10.
146. WHITE J. „*Yeast Technology*", Londra, 1954.
147. WHITE P. și GRAY P. P. În: Biotechnol., Bioeng., 19, 1977, 575.
148. WILDIERS E. În: Cellule, *18*, 1901, 311.
149. WINSLOW, C. E. A. și WALKER, H. H. În: Bact. Rev., 1939, 147.
150. YAMANE T. și HIRANO S. În: J. Ferment. Technol., 55, 1977, 156.
151. YAMANE T. și SHIMIZU S. În: Advs. Biochem. Eng., *30*, 1984, 174.
152. YANO T. În: Agric. Biol. Chem. *30*, 1966, 42.
153. YOSHIDA F. În: Biotechnol. Bioeng., *15*, 1973, 257.
154. ZARNEA G., MENCINICOPSCHI GH. și BRĂGĂREA ST. „*Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*", Editura Tehnică, București, 1980.
155. ZARNEA G. „*Tratat de microbiologie generală*", vol. 2, Editura Academiei, București, 1984.

3. TEHNOLOGIA DE FABRICARE A DROJDIEI FURAJERE UTILIZÎND CA SUBSTRAT SOLUŢIILE SULFITICE REZIDUALE ŞI PREHIDROLIZATELE DE LA FABRICAREA CELULOZELOR

C. STANCIU, G. ROZMARIN, MARIA HERCZEGH

3.1. PROCEDEE DE FABRICARE A CELULOZELOR

Celuloza reprezintă componentul chimic principal al plantelor superioare şi se poate obţine prin solubilizarea substanţelor însoţitoare cum sînt : lignina, hemicelulozele, grăsimile, taninurile etc.

Majoritatea celulozei se produce în prezent din lemn de răşinoase din zona temperată. Ca urmare a deficitului de lemn de răşinoase s-a extins utilizarea lemnului de foioase, prevăzîndu-se o creştere şi mai accentuată în viitor. În prezent, aproximativ 30% din cantitatea totală de lemn folosit în scopuri industriale o reprezintă lemnul de foioase.

În tabelul 28 se prezintă compoziţia chimică medie a lemnului de esenţă moale şi esenţă tare, iar în fig. 47 compoziţia chimică a lemnului de molid şi mesteacăn.

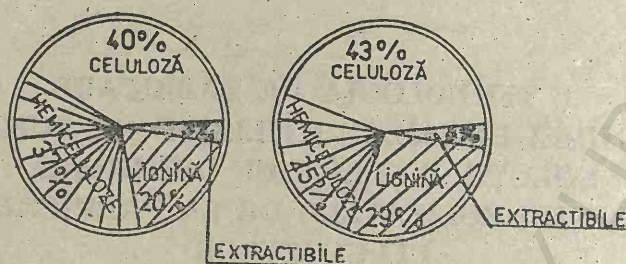
Deoarece, lignina constituie substanţa de bază care se elimină în procesul de obţinere a celulozei (circa 90%), acest proces poartă numele de delignificare sau dezincrustare.

Tabelul 28

Compoziţia chimică medie a lemnului de esenţă moale şi esenţă tare (în %)

Componentul	Lemn esenţă moale	Lemn esenţă tare
Celuloză	42±2	45±2
Hemiceluloze	27±2	30±5
Lignină	28±3	20±4
Substanţe extractive	3±2	5±3

COMPOZIȚIA LEMNULUI



MESTEACĂN

PIN

Fig. 47. Compoziția chimică a lemnului de molid și de mesteacăn.

Delignificarea se realizează la temperatură și presiune ridicată, după o anumită diagramă de fierbere în prezența unor substanțe chimice specifice, acest proces purtînd denumirea de fierbere. Pasta fibroasă rezultată prin delignificarea țesuturilor vegetale se numește pastă chimică sau celuloză.

Eliberarea celulozei de încrustare are la bază proprietatea unor substanțe de a reacționa mai repede cu lignina decît cu polizaharidele.

Procedeele cunoscute de fabricare a celulozei pot fi împărțite în următoarele cinci grupe: procedee acide, procedee alcaline, procedee neutre, procedee oxidative și procedee combinate (Obrocea și colab. 1987).

Din grupa procedeelor de dezîncrustare cu reactivi acizi fac parte: procedeul sulfit, procedeul bisulfit și procedeul cu acid azotic.

Procedeul sulfit. Folosește pentru dezîncrustarea lemnului așa-numita soluție bisulfitică cu un conținut ridicat de SO_2 liber la un *p*H de plecare de 1—2.

Baza poate fi calciu, magneziu, sodiu sau amoniu.

Procedeul bisulfit. Leșia de fierbere conține SO_2 liber puțin sau de loc, iar ionul bisulfit predomină în soluție într-un domeniu de *p*H = 2—6. În mod normal se pot folosi ca baze de sodiu, magneziu sau amoniu, baza calciu fiind insolubilă pentru utilizarea practică.

Procedeul sulfit neutru (NSSC). Leșia conține în principal ionul sulfit și este menținut în domeniul de *p*H = 7—9 prin utilizarea Na_2CO_3. În mod normal se folosește sodiu sau amoniu ca bază.

Din grupa procedeelor combinate de fierbere pentru valorificarea produselor secundare prezintă interes *procedeul sulfat cu prehidroliză.*

Procedeul sulfat cu prehidroliză. Permite fabricarea celulozelor de mare puritate pentru prelucrări chimice. În acest procedeu eliminarea pentozanilor în proporție de 80—90% se realizează premergător fierberii sulfat printr-o hidroliză acidă sau mai economic cu apă (autohidroliză), la temperaturi de 170...173°C (Stanciu, 1974, 1987).

În tabelul 29 se prezintă producția de paste fibroase în lume pe perioada 1987—1992, din care rezultă că ponderea o deține procedeul sulfat de fabricație a celulozei (Pulp, Paper International, 1989).

Producţia de paste firboase în lume, mii t/an
(Pulp, Paper International, 1988)

Caracteristici	1987	1988	1989	1990	1991	1992	Viteza de creştere în perioada 1987–1992
Celuloză-sulfat albită	58 270	59 650	61 370	64 400	65 860	67 350	2.6%
Celuloză-sulfat nealbită	38 730	38 820	38 770	38 790	39 110	39 110	—
Celuloză-sulfit	10 710	10 490	10 620	10 490	10 490	10 490	0,2%
Alte paste chimice incluzînd şi pastele semichimice	24 460	24 500	24 540	24 780	24 780	24 780	−0,2%
CMP/BCTMP	5 050	6 000	6 740	7 250	7 490	7 590	0,4%
SGW/PGW/RMP/TMP	33 950	35 270	37 010	37 950	38 240	38 400	2,2%
Total în lume	171 170	174 730	179 050	183 660	185 970	187 720	
Rata de creştere anuală		2,1%	2,5%	2,5%	1,5%	1%	1,6%

În fierberea sulfat, dezîncrustarea materiilor vegetale se face cu soluţii apoase de hidroxid şi sulfură de sodiu.

Fierberea este operaţiunea de bază în fabricarea celulozei. După fierbere, urmează spălarea pastei celulozice care are ca scop, pe de o parte, separarea fibrelor celulozice de soluţiile reziduale de la fierbere şi, pe de altă parte, să recupereze în măsură cît mai mare şi cît mai puţin diluaţi reactivii folosiţi la fierbere.

De la faza de spălare în cazul fierberilor sulfit şi bisulfit sînt colectate leşiile reziduale care sînt valorificate în principal pe linia obţinerii alcoolului etilic, a drojdiilor furajere şi a lignosulfaţilor.

În cazul procedeului sulfat cu prehidroliză, recuperarea prehidrolizatului care este valorificat pe linia obţinerii furfurolului şi a drojdiilor furajere se face după efectuarea fazei de prehidroliză.

La nivelul anului 1980, producţia mondială aproximativă de subproduse din leşiile reziduale din industria celulozei a fost de 1 890 mii tone (tabelul 30).

Tabelul 30

Producţia mondială de subproduse din leşiile reziduale din industria celulozei
(PNUE — Colection industrie et environnement. Gestion de l'environnement dans industrie de la pâte et du papier, 1980)

Producţia	Capacitate (t/an)
Lignosulfonaţi	700 000
Lignina Kraft	30 000
Drojdie furajeră	1 000 000
Etanol	100 000
Melasă din lemn	60 000

3.2. POTENȚIALUL DE PRODUȘI SECUNDARI LA FABRICAREA CELULOZELOR

Produșii secundari de la fabricarea celulozei se împart în produși pe bază de glucide, lignină și substanțe extractibile. Cerințele pentru produsul principal, celuloza, determină condițiile în care se fabrică produșii secundari. Substanțele pe bază de glucide sînt produse prin hidroliza hemicelulozelor și într-o măsură mai mică a celulozei însăși. În producerea celulozelor chimice, conținutul de hemiceluloze este redus prin hidroliză acidă (prehidroliză). În fig. 48 se prezintă variația conținutului de alfa-celuloză funcție de conținutul de pentozani rezistenți din celuloză.

O dependență similară a fost observată și de celulozele chimice sulfit. Cantitatea de zaharuri valorificabile este dependentă în mare măsură de proprietățile celulozei produse. În producerea celulozei papetare unui conținut ridicat de hemiceluloze este lăsat deliberat în produs, ceea ce conduce la reducerea cantității de zaharuri în leșia reziduală.

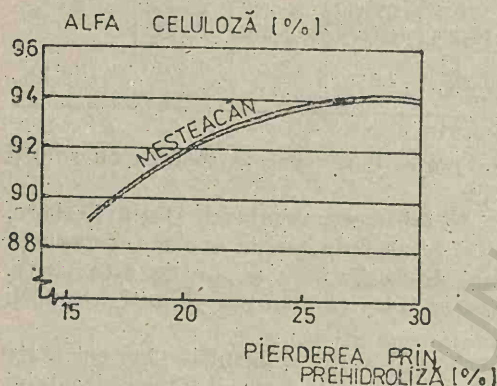


Fig. 48. Corelația dintre pierderea la prehidroliză și conținutul de *alfa*-celuloză în cazul lemnului de mesteacăn.

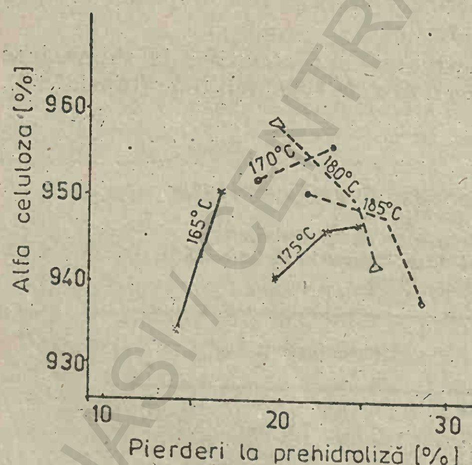


Fig. 49. Corelația dintre pierderea la prehidroliză și conținutul de *alfa*-celuloză în cazul lemnului de fag la diverse temperaturi de prehidroliză.

În faza de fierbere acidă, majoritatea hemicelulozelor este hidrolizată în monozaharide, ceea ce este avantajos pentru fabricarea produselor secundare. Celulozele chimice pot fi produse prin procedeul sulfat cu prehidroliză sau sulfit. Legătura dintre procedeul de fabricare a celulozei și fabricarea produșilor secundari este ilustrată clar în cazul procedeului sulfat cu prehidroliză.

În procedeul sulfat cu prehidroliză, cantitatea de zaharuri depinde de pierderea prin hidroliză în faza de prehidroliză și de cantitatea de prehidrolizat care poate fi extrasă din fierbător.

În fig. 48 se prezintă corelația dintre pierderea la prehidroliză și conținutul de alfa-celuloză în cazul utilizării lemnului de mesteacăn (Touminen, 1986), iar în fig. 49 aceeași corelație în cazul lemnului de fag (Stanciu, 1987).

La producerea de celuloză chimică din mesteacăn nivelul dorit de alfa-celuloză este atins la o pierdere la prehidroliză de 22—27%, la pin la o pierdere de 15—20%, iar la fag o pierdere de 20%.

Este cunoscut faptul că randamentul în zaharuri în funcţie de durata hidrolizei creşte la început, atingînd punctul maxim, după care scade, deoarece reacţia de hidroliză a hidraţilor de carbon se compune din două reacţii similare, de formare a zaharurilor şi de distrugere a acestora.

În fig. 50 se prezintă cantitatea de zaharuri obţinută în hidrolizat, funcţie de pierderea la hidroliză, în hidroliza acidă.

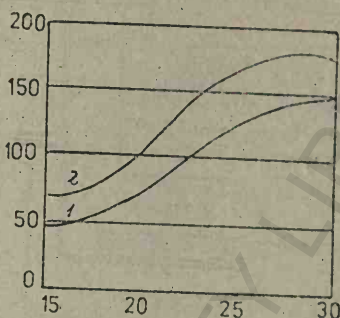


Fig. 50. Cantitatea de zaharuri obţinută în hidrolizat, funcţie de pierderea la hidroliză, în cazul lemnului de pin (*1*) şi de mesteacăn (*2*).

În timpul fierberii sulfit, hemicelulozele sînt îndepărtate şi majoritatea ligninei se dizolvă ; din acest motiv zaharurile din leşiile sulfitice reziduale sînt mai greu exploatabile.

Potenţialul de produşi secundari în procedeul sulfat cu prehidroliză şi procedeul sulfit este prezentat comparativ în fig. 51 şi fig. 52, în cazul utilizării lemnului de pin şi de mesteacăn, la o producţie de 100 000 t/an celuloză (Kovasin, 1985). În acest caz conţinutul de alfa-celuloză a fost de 93–94%, pierderea la prehidroliză la pin a fost de 17%, iar la mesteacăn de 25%.

Din fig. 51 şi 52 se poate observa că există o diferenţă mică între cantitatea de produse secundare pe bază de zaharuri obţinute prin procedeul sulfat cu prehidrolitză şi procedeul sulfit.

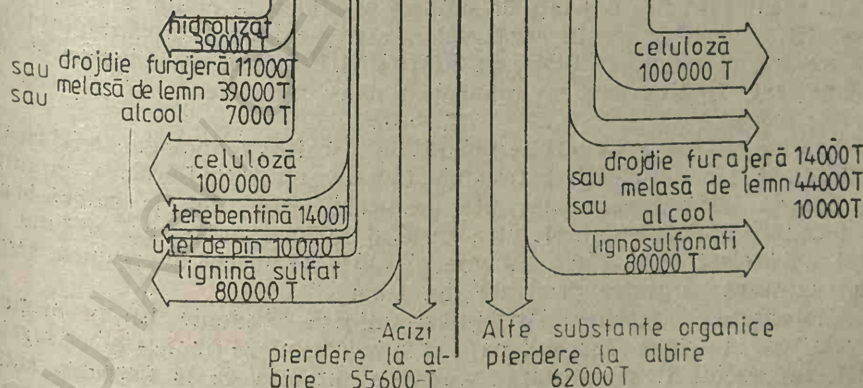


Fig. 51. Potenţialul de produse secundare la fabricarea celulozei chimice din pin.

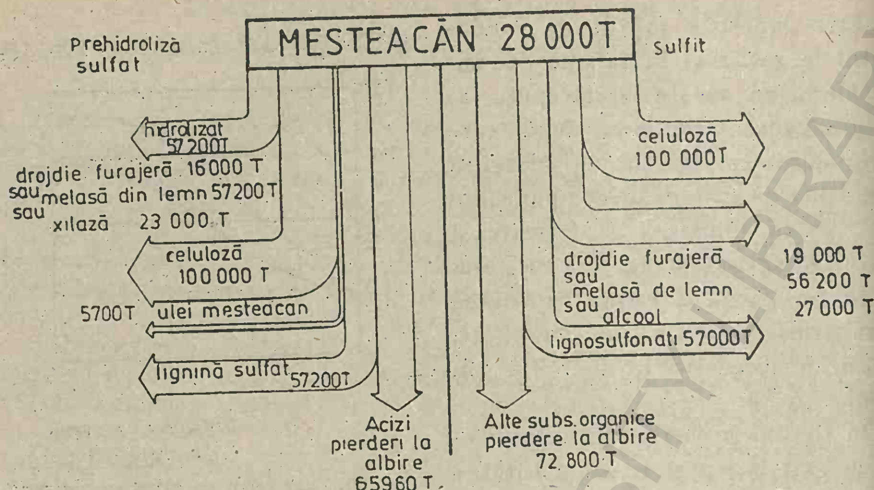


Fig. 52. Potențialul de produse secundare la fabricarea celulozei chimice din mesteacăn.

3.3. COMPOZIȚIA SOLUȚIILOR SULFITICE REZIDUALE

La fabricarea celulozelor sulfit rezultă importante cantități de soluții reziduale (8—11 m³/t celuloză), pentru valorificarea cărora s-au făcut numeroase cercetări în toate țările încă de la începutul fabricării celulozelor din lemn prin procedeul sulfit (Melms, Schvenzon, 1976 : Poland și colab., 1968, Schmidt, 1972, Hajons 1984, Slavin, 1989).

Interesul deosebit ce se acordă valorificării sub diferite forme a soluțiilor sulfitice reziduale se datorează necesității rezolvării acestei probleme sub două aspecte principale :

— valorificarea substanțelor organice dizolvate din lemn în procesul de fierbere, care reprezintă cantități aproape egale cu cele ale celulozei fabricate prin aceasta realizîndu-se valori suplimentare din lemnul utilizat în fabricație ;

— reduceri importante ale volumului de substanțe nocive deversate în cursurile de apă care, receptînd aceste soluții, devin practic rîuri moarte.

În cazul valorificării soluțiilor sulfitice reziduale în etanol are loc reducerea CBO_7 cu 40%, iar în cazul valorificării pe linia fabricării drojdiilor furajere are loc reducerea CBO_7 cu 80% (PNUE-Collection industrie et environnement. Gestion de l'environnement dans industrie de la pâte et du papier, 1980).

Soluția sulfitică reziduală se separă din circuitul tehnologic al fabricării celulozei, în procesul spălării materialului fibros rezultat din fierberea lemnului.

Soluția sulfitică reziduală este un lichid brun pînă la galben-brun, cu densitate optimă cuprinsă între 1,040 și 1,070 g/cm³ și un conținut de substanță uscată de 8—15%, din care 10—30% de natură anorganică, restul fiind substanțe organice dizolvate din lemn.

Majoritatea componentelor leșiilor sulfitice reziduale își au originea în principal în lignină (lignosulfonați) și în hemiceluloze (mono- și oligozaharide). În tabelul 31 se prezintă produsele obținute de la fierberea sulfit, iar în tabelul 32 sînt prezentate produsele utile care pot fi obținute pornind de la aceste leșii (Sjöstrom, 1981).

Tabelul 31

Produse obținute de la fierberea sulfit (în kg/t)
(Sjöstrom, 1981)

Componentul	Molid Randament 52%	Mesteacăn Randament 49%
Lignosulfonați [a]	480(540)	375
Lignosulfonați cu M > 5 000	245(280)	55
Hidrați de carbon [b]	280	375
Arabinoză	10	10
Xiloză	60	340
Manoză	120	10
Galactoză	50	10
Glucoză	40	5
Acizi aldonici	50	95
Acid acetic	40	100
Substanțe extractibile	40	40
Alți compuși	40	60

a) Calculat ca lignină. Valorile estimate pentru lignosulfonați sînt date în paranteză (calculate presupunînd că gradul de sulfonare este de 25 miliechivalenți/g lignină).
b) 80—85% monozaharide, restul fiind poli și oligozaharide.

Tabelul 32

Subprodușii principali bazați pe leșia sulfit reziduală
(Sjöstrom, 1981)

Produsul	Cantitatea, kg/t	Metoda de separare	Utilizare
Lignosulfonați	400—550	Evaporare, precipitare ultrafiltrare, electrodializă, excludere ionică	Aditivi (noroiextracție petrol, ciment Portland), agenți de dispersie și lianți (textile, ind. poligrafică, suspensii minerale), materie primă „(vanilină, dimetilsulfoxid etc.).
Zaharuri și acizi aldonici	300—450	Evaporare, ultrafiltrări, schimb ionic, electrodializă, excludere ionică	Industria alimentară și industria chimică
Alcool etilic	40—60	Fermentare, distilare	Industria alimentară și chimică (solvenți, materie primă)
Proteine	90—110	Fermentare	Industria alimentară și a nutrețurilor
Acid acetic	30—80	Extracție, distilare	Industria alimentară și chimică (solvent și materie primă)
Furfurol	10—15	Adsorbție, distilare	Industria materialelor plastice și lacurilor
Butanol, acetonă, acid lactic	30—40	Fermentare, extracție distilare	Industria materialelor plastice și lacurilor (solvent, materie primă)
Cimen	0,3—1,0	Distilare	Industria materialelor plastice și lacurilor (solvent).

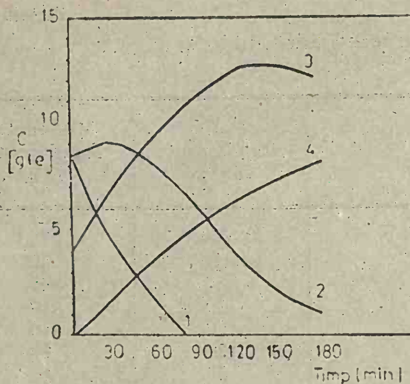


Fig. 53. Variaţia compoziţiei prehidrolizatului din lemn de fag ($T = 170°C$, $H = 1:3,5$) în funcţie de durată: *1* — oligoxilani; *2* — xiloză; *3* — furfurol; *4* — produse de condensare.

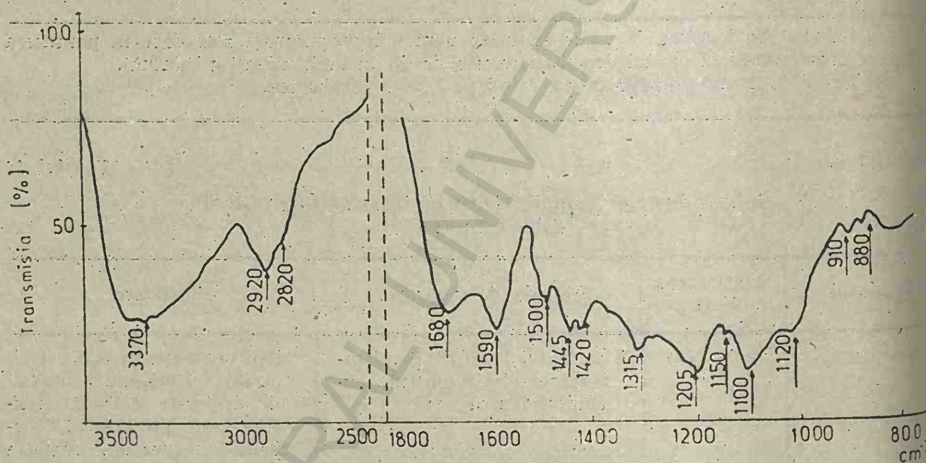


Fig. 54. Spectrul IR al depunerilor de la prehidroliza lemnului de fag.

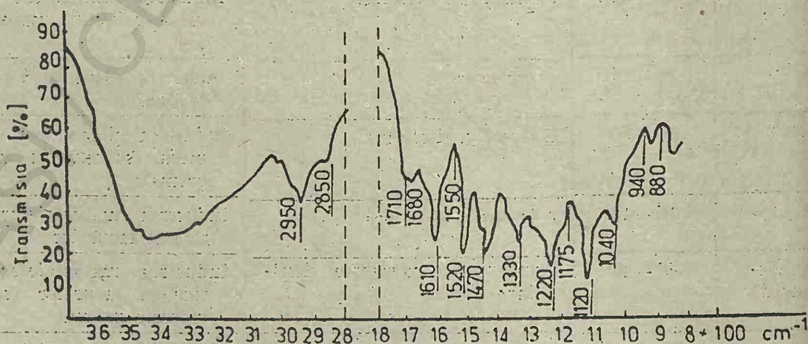


Fig. 55. Spectrul IR al depunerilor de la inversia prehidrolizatului din lemn de fag.

Compoziţia soluţiilor sulfitice reziduale variază foarte mult, fiind funcţie de o serie de factori cum ar fi sortimentul de celuloză fabricat, specia de lemn utilizată, natura şi concentraţia soluţiei de fierbere, dotarea tehnică a unităţii producătoare şi tehnologia de fabricaţie adoptată.

Randamentul total de monozaharide în leşia sulfit scade cu creşterea randamentului în celuloză (fig. 53). Astfel, la un randament în celuloză de 47%, randamentul în monozaharide este de 130—137 kg/t lemn, iar la un randament de 50% scade de la 126 kg/t lemn (Sarkov., Kuibina, 1972). Un conţinut mai mic de zaharuri, deci o distrucţie limitată a polizaharidelor, va avea loc în cazul fabricării celulozelor de mare randament, a celulozelor cu un grad de dezincrustare scăzut, a celulozelor pergaminabile, la care se aplică un procedeu menajat de fierbere, în vederea reţinerii hemicelulozelor.

Astfel, la fierberea de randament normal (pînă la 50%), randamentul în monozaharide reprezintă 15—16% din greutatea lemnului de răşinoase, iar la celuloza de mare randament (pînă la 60—65%), 12—13%. La fabricarea hemicelulozei (randament 70—75%) leşia conţine 2/3 oligozaharide care pot fi utilizate la fabricarea drojdiilor furajere numai după operaţiunea de inversie (fig. 54 şi 55).

Figura 56 reprezintă comparativ randamentul în monozaharide (în kg/t lemn), funcţie de randamentul în celuloză la o fierbere sulfit şi bisulfit de sodiu a lemnului de molid, remarcîndu-se superioritatea procedeului suflit de sodiu, în ceea ce priveşte conţinutul de monozaharide.

Cantitatea de zaharuri existente în leşiile sulfit reziduale este direct proporţională cu temperatura şi turnusul (durata) de fierbere (fig. 57).

Aşa cum rezultă din fig. 57, concentraţia zaharurilor scade foarte mult cu depăşirea temperaturii de 155°C. Acest lucru este explicabil prin acţiunea de descompunere a monozaharidelor care are loc în condiţiile mediului puternic acid şi a temperaturii ridicate.

În ceea ce priveşte influenţa bazei asupra randamentului în substanţe reducătoare totale, se remarcă o scădere a acestuia cu creşterea concentraţiei bazei (fig. 58).

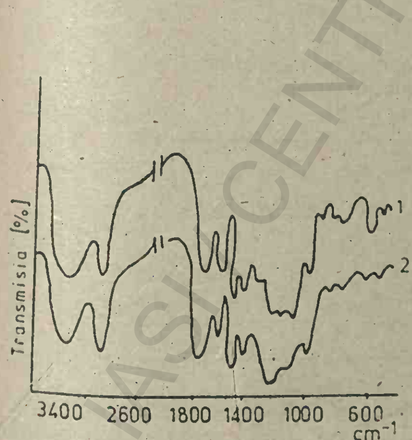


Fig. 56. Spectrul IR al depunerilor de la inversia prehidrolizatului din lemn de molid (Moscovţev, Strelskaia, 1986): *1* — depunere; *2* — lignină sulfat.

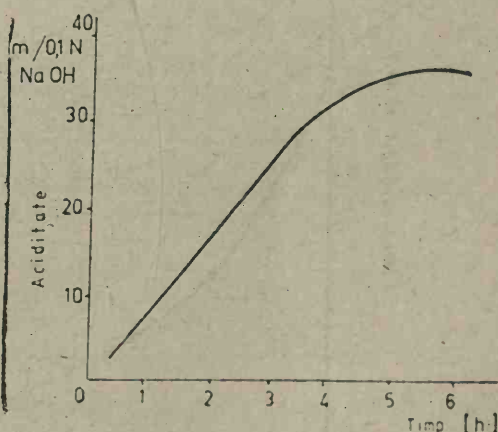


Fig. 57. Aciditatea prehidrolizatului din lemn de fag, funcţie de timp la $T = 170°C$ şi $H = 1:3,5$.

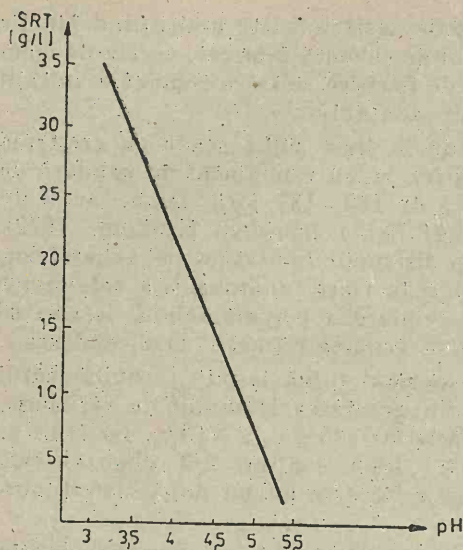


Fig. 58. Variaţia conţinutului de substanţe reducătoare totale funcţie de *p*H la prehidroliza lemnului de fag.

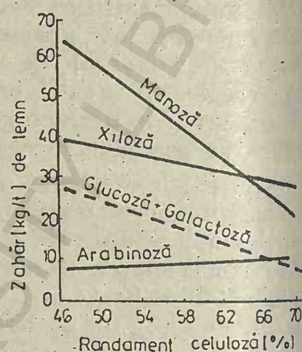


Fig. 59. Conţinutul de zaharuri din leşia sulfit funcţie de randamentul în celuloză, în cazul utilizării lemnului de brad.

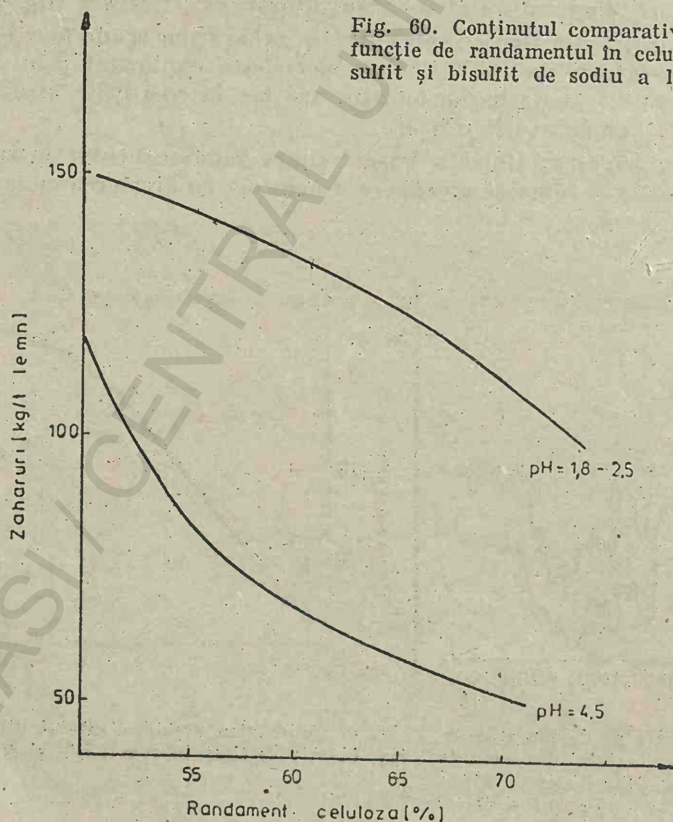


Fig. 60. Conţinutul comparativ de zaharuri în funcţie de randamentul în celuloză la o fierbere sulfit şi bisulfit de sodiu a lemnului de molid.

Compoziţia calitativă a zaharurilor din leşiile sulfitice reziduale este funcţie de specia de lemn utilizată la fierbere (răşinoase sau foioase) (fig. 59 şi 60).

Soluţiile sulfit reziduale de la fabricarea celulozei din foioase conţin în general aproximativ 70% pentoze şi 30% hexoze, în timp ce proporţia de zaharuri în soluţiile reziduale de la fabricarea celulozei din răşinoase este aproximativ 80% hexoze şi 20% pentoze.

Tabelul 33 prezintă comparativ compoziţia în monozaharide a leşiilor sulfit reziduale provenite din diverse specii de lemn (Sjöstrom, 1981). Din tabelul 33 se constată că în leşiile sulfit provenite din lemn de esenţă tare, xiloza este componentul monozaharic principal (21–24%) pe cînd, în cazul lemnului de esenţă moale, componentul monozaharidic dominant este manoza (11%).

Tabelul 33

Monozaharidele din leşiile sulfit reziduale din diverse specii de lemn
(Schmidt 1972)

Conţinutul în monozaharide % faţă de lemn a.u.	Specia de lemn		
	Molid	Mesteacăn	Plop
Galactoză	2,6	0,6	0,0
Glucoză	2,6	1,1	0,5
Manoză	11,0	6,4	3,1
Xiloză	4,6	21,1	24,3
Arabinoză	0,9	0,0	1,5
Acid glucuronic	1,0	1,6	1,2
Total	22,7	30,8	30,6

Leşiile sulfit provenite din lemn de esenţă tare şi moale diferă semnificativ una de alta şi în ceea ce priveşte conţinutul de acid acetic (tabelul 34).

Tabelul 34

Conţinutul de acid acetic din leşiile sulfit reziduale provenite din diverse specii de lemn
(Passinen, Sjöstrom, 1974)

Specia de lemn	Conţinutul de acid acetic, % faţă de lemn a.u.
Molid	3,1
Mesteacăn	8,0
Carpen	9,6
Eucalipt	9,2

Leşia sulfit reziduală din lemn de molid conţine 3,1% acid acetic (component asimilabil de către drojdii), în timp ce leşia sulfitică din lemn de esenţă tare conţine 8–11% acid acetic (Passinen, Sjöstrom, 1974).

În procesul fierberii sulfit se desfăşoară simultan reacţia de descompunere a monozaharidelor formate (Rozmarin, 1984). Toate hexozele se trans-

Tabelul 35

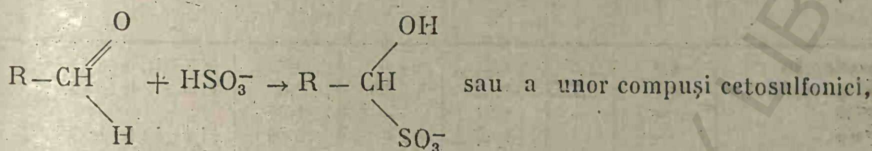
Caracteristicile fizico-chimice ale unor leşii sulfit reziduale

Caracteristici	U/M	Soluţie bisulfit de calciu (molid)		Soluţie bisulfit de sodiu (molid) $pH = 4,5$		Soluţie sulfit de sodiu (molid) $pH =$ $= 1,8-2,2$	Soluţie sulfit de amoniu (molid). Randament 44—46%	Soluţie bisulfit de amoniu (molid). Randament 58—60%	Soluţie bisulfit de amoniu (fag)
		Celuloză 1-A	Celuloză pergaminabilă						
Indice de dezincrustare Kappa	—	—	—	45—35	45—90	18—30	—	—	—
pH	—	2,6	2,3	—	—	—	1,8—2,2	3,2	—
Aciditate liberă	ml NaOH 0,1N la 100 ml sol.	60	110	—	—	—	175—185	—	—
Acizi organici volatili (exprimaţi ca CH_3COOH)	g/l	1,6	—	2,5—3,2	2,0—2,8	4,0—6,0	4—5	3,7	15,4
SO_2 titrabil direct	g/l	—	—	5—12	12—17	2,2—5,0	2—3	6,0	1,85
SO_2 liber	g/l	0,48—1,63	—	0,2—1,0	8—11	0,5—2,5	—	—	—
SO_2 legat organic	g/l	—	—	6—8	5—7	6,0—7,5	—	—	—
SO_2 legat anorganic	g/l	—	—	4,8—11,0	6—7	1,5—2,0	—	—	—
Furfurol	g/l	0,08—0,1	—	0,2—0,4	0,1—0,2	0,7—1,0	0,3—0,7	0,35	2,82
Metanol	g/l	0,24	—	—	—	—	0,4—0,6	0,35—0,40	—
Substanţă uscată, din care:	g/l	46,0—77,5	94,94	150—170	140—150	150—170	114—165	145	122
— substanţe organice	%	90,4	—	125—142	112—128	130—145	98,04	98,5	98,32
— substanţe anorganice	%	9,6	—	25—28	28—32	20—25	1,96	1,5	1,68
Substanţe reducătoare totale	g/l	16—21	23,02	27—33	25—28	37—45	45—55	24—33	56,0
Zaharuri	g/l	14—18,9	20,52	20,2—26,4	17,5—21,0	26—36	—	—	—

formă parțial în oximetilfurfurol care se descompune cu formarea acidului levulinic și a substanțelor humice macromoleculare.

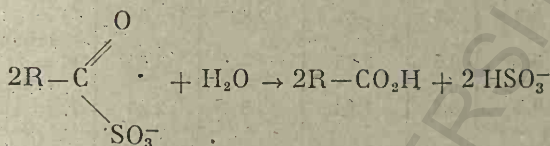
Pentozele se descompun prin deshidratarea în furfurol, ramnoza în metilfurfurol, iar acizii uronici și esterii lor metilici în dioxid de carbon și furfurol.

Aceste reacții de distrucție afectează randamentele finale în monozaharide, în funcție de regimul folosit la fierbere. Se constată de asemenea formarea unor compuși aldehidbisulfitici instabili între zaharuri și ionii bisulfit:



$$R-CH(=O)H + HSO_3^- \rightarrow R-CH(OH)SO_3^-$$ sau a unor compuși cetosulfonici,

transformabili în acizi aldonici:



$$2R-C(=O)SO_3^- + H_2O \rightarrow 2R-CO_2H + 2\,HSO_3^-$$

și care au o influență majoră asupra randamentului în monozaharide, pierderile fiind mai mari la baza de amoniu, mai mici la bazele de magneziu și minime la baza de sodiu.

În tabelul 35 sînt redate comparativ caracteristicile fizico-chimice ale unor leșii sulfit reziduale obținute din lemn de molid și fag, utilizînd diverse tehnologii de fierbere.

Din datele acestui tabel reiese că leșiile sulfit reziduale, provenite de la fierberea lemnului de molid, au un conținut de furfurol mult mai scăzut (0,1—1,0 g/l) decît în cazul leșiilor provenind de la fierberea lemnului de fag (2,82 g/l). Acest fapt necesită, în cazul valorificării acestor leșii pe linia obținerii drojdiilor furajere, diminuarea conținutului de furfurol pînă la un nivel acceptabil multiplicării drojdiilor.

3.4. COMPOZIȚIA PREHIDROLIZATELOR

Condițiile de efectuare a prehidrolizei și natura meteriei prime influențează atît caracteristicile calitative ale celulozei chimice cît și compoziția prehidrolizatelor.

Prehidrolizatele au o compoziție complexă care constă din mono- și oligozaharide, furfurol și derivații săi, acizi organici (formic, acetic), metanol, acetonă (Stanciu, 1974).

În tabelul 36 se prezintă comparativ compoziția prehidrolizatelor obținute la fabricarea celulozei chimice din lemn de foioase și rășinoase (Rozmarin, Stanciu, Ciobanu, 1986).

Compoziția monozaharidică a prehidrolizatelor este redată în tabelul 37, constatîndu-se că prehidrolizatele ce provin din lemn de foioase sînt mult mai bogate în pentoze față de prehidrolizatele din lemn de rășinoase.

În compoziția prehidrolizatelor se constată și prezența unor substanțe coloidale, care provoacă mari dificultăți de prelucrare chimică și biochimică a prehidrolizatelor. Formarea depunerilor este în strînsă corelație cu formarea furfurolului. (Brabec, Radej, 1967).

Tabelul 36

Compoziţia prehidrolizatelor de la fabricarea celulozei chimice din lemn de foioase şi răşinoase

Specia de lemn	Substanţă uscată, %	pH	Substanţe reducătoare totale, %	Zahar, %	Furfurol, g/l	Condiţii de prehidroliză
Mesteacăn	4,2	3,7	1,71	1,0	3,7	H = 1 : 4, la 165°C, 90 min
Plop tremurător	3,7	3,7	1,63	0,88	3,6	H= 1 : 4, la 165°C, 90 min
Plop	—	—	1,21	—	1,25	—
Plop	—	—	1,17	—	0,38	H = 5 : 1 la 170°C, 60 min
Fag	9,15	3,8	7,57	3,87	5,22	H = 1 : 1,15—1,2 la 170—175°C 120 min
Fag	5,3	3,5	3,6	2,88	3,6	H = 1 : 3, la 170°C 110 min
Fag	5,85	3,5	3,65	—	3,65	H = 1: 3,5 la 170°C, 110 min
Fag	9,0	3,8	1,64	0,8	2,84	H = 1 : 3,5 la 170°C, 110 min
Răşinoase	8,19—8,51	3,65 3,9	1,3—2,9	—	0,5—0,7	—
Răşinoase	—	3,4	3,28	2,8	1,19	H = 1 : 3, la 175°C, 110 min
Răşinoase (pin)	15,0	3,4	1,71	1,02	—	H = 1 : 6, la 160°C, 120 min
Răşinoase	4,1	3,4	1,9	—	—	H=1 : 4, la 168°C, 90 min

Prehidrolizatele provenite de la prehidroliza lemnului de foioase conţin mai mult furfurol decît prehidrolizatele din răşinoase şi, datorită acestui fapt, depunerile se formează mult mai intens în cazul prehidrolizatelor din

Tabelul 37

Compoziţia monozaharidică a prehidrolizatului de la fabricarea celulozei chimice

Componentul	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*
Xiloză	33,8	28,0	31,81	29,75	72,30
Arabinoză	8,6	19,0	22,72	19,51	2,32
Metilpentoze	6,1	—	—	—	—
Oligopentoze	10,0	—	—	—	—
TOTAL PENTOZE	58,5	47,0	54,53	49,25	81,62
Manoză	12,0	26,0	30,30	29,26	5,41
Riboză	9,2	—	—	—	—
Ramnoză	5,0	—	—	—	—
Glucoză	—	11,0	—	6,82	6,76
Galactoză	—	16,0	15,15	14,63	6,18
Glucoză + Galactoză	8,6	27,0	—	21,45	12,94
TOTAL HEXOZE	34,8	53,0	45,45	50,71	18,33
Acid glucuronic	3,5	—	—	—	—
Acid galacturonic	5,0	—	—	—	—
TOTAL ACIZI URONICI	8,5				

A — prehidrolizat fag (H = 1 : 1,15—1,2 la 170°C timp de 120 min);
B — prehidrolizat pin (H = 1 : 6 la 160°C timp de 100 min);
C — prehidrolizat pin (T = 170°C); *D* — prehidrolizat zadă (T = 170°C);
E — soluţia reziduală de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag prin procedeul bisulfit de amoniu.

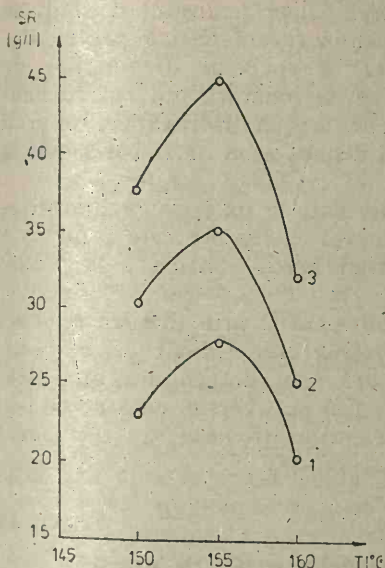


Fig. 61. Variaţia concentraţiei în substanţe reducătoare, funcţie de temperatura de fierbere, în cazul fierberii bisulfit de sodiu în mediu slab acid a lemnului de molid:
1 — durata de fierbere 1 oră;
2 — durata de fierbere 2,5 ore;
3 — durata de fierbere 2,0 ore.

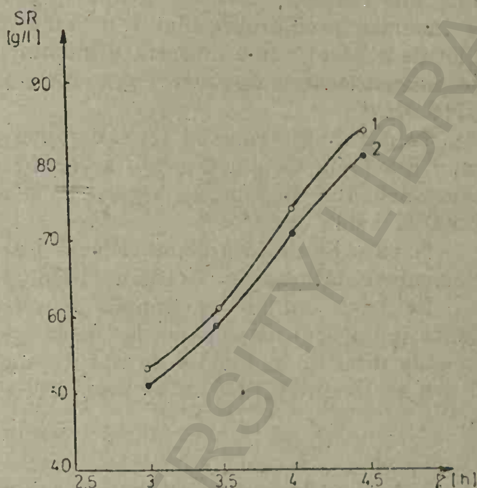


Fig. 62. Variaţia comparativă a concentraţie în substanţe reducătoare, funcţie de durata de fierbere, în cazul fierberilor sulfit cu bază de calciu şi sodiu:
1 — fierbere sulfit cu bază de calciu;
2 — fierberea sulfit cu bază de sodiu.

lemn de foioase. Acest fapt conduce la o prelucrare mult mai dificilă a prehidrolizatelor din lemn de foioase în comparaţie cu prehidrolitzatele provenite din lemn de răşinoase care se prelucrează mult mai uşor.

T a r a s y u k (1978) arată că prezenţa a 0,6 g substanţe humice pe 100 ml substrat conduce la reducerea randamentului de obţinere a drojdiilor furajere cu 62,7%. Acţiunea toxică a substanţelor coloidale este o urmare a slăbirii activităţii fermentative şi respiratorii a drojdiilor (Rozmarin, Stanciu, 1985).

Pentru trecerea oligozaharidelor în forme asimilabile de către drojdii, se foloseşte inversia cu acid sulfuric. În cazul inversiei se constată creşterea conţinutului de depuneri o dată cu creşterea duratei de inversie. Se consideră că substanţele coloidale din prehidrolizat sînt stabilizate de acţiunea protectoare a polizaharidelor care dispare la inversie (fig. 61).

Analizînd depunerile de la prehidroliză şi de la inversia prehidrolizatului prin metoda spectroscopici în IR şi comparînd aceste spectre cu spectrele ligninelor neutre, se constată o uniformitate a spectrelor, care confirmă natura identică (aromatică) a preparatelor cercetate (fig. 62 şi 63).

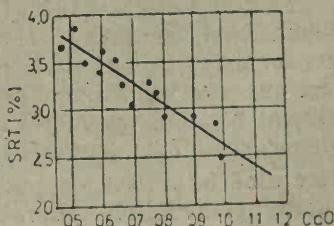


Fig. 63. Variaţia concentraţiei în substanţe reducătoare totale funcţie de concentraţia bazei.

În cazul spectrului depunerilor de la prehidoliza lemnului de fag, se remarcă prezența benzii de la 1 100 cm⁻¹ (banda caracteristică pentru lignina din foioase), datorită grupei OCH_3, iar în spectrul depunerilor de la inversia prehidrolizatului din lemn de fag se constată micșorarea benzilor de absorbție față de spectrul depunerilor de la prehidroliză (deci un grad de policondensare mai mare) sau unele benzi dispar, cum ar fi banda de la 1 710 cm^{-1}.

În cazul spectrului în IR a depunerilor formate la inversia prehidrolizatului din lemn de pin (fig. 56) se confirmă faptul că lignina este principala componentă a depunerilor, spectrul prezentînd benzi conturate la 1 595, 1 500 și 1 425 cm^{-1}.

Natura ligninică a depunerilor a fost confirmată și prin metoda analizei elementare (Rozmarin, Stanciu, 1978, 1989) (conținut ridicat de carbon).

Pe baza datelor de compoziție elementară s-au determinat formulele limită (empirice) ale depunerilor de la prehidroliză și inversie, constatîndu-se formule diferite în funcție de natura materiei prime (foioase sau rășinoase) și a hidromodulului folosit la prehidroliză (tabelul 38).

Tabelul 38

Analiza depunerilor rezultate în procesul de prehidroliză și de inversia prehidrolizatelor

Felul depunerii	Conținutul de: C, %	H, %	O, %	OCH_3, %	Formula limită (empirică)
Depuneri de la prehirdoliza lemnului de fag ($H = 1:2$, $T = 170°C$)	59,70	5,00	34,65	12,53	$C_9H_{7.35}O_{3.44}(OCH_3)_{0.78}$
Depuneri de la prehidroliza lemnului de fag ($H = 1:3,5$, $T = 170°C$)	54,40	4,90	37,60	15,80	$C_9H_{7.47}O_{4.10}(OCH_3)_{1.11}$
Depuneri de la inversia prehidrolizatului din lemn de fag	59,93	4,98	23,37	9,80	$C_9H_{7.68}O_{3.46}(OCH_3)_{0.79}$
Depuneri de la inversia prehidrolizatului din lemn de pin	63,60	6,30	30,1	10,20	$C_9H_{9.53}O_{2.80}(OCH_3)_{0.57}$

Pe baza datelor prezentate, se poate afirma că depunerile de la prehidroliză sînt rezultatul reacțiilor de policondensare în mediu acid dintre compușii fenolici, furfurol și derivații săi.

În ceea ce privește conținutul de depuneri, Orlov (1977) indică un conținut de 2,8–3,2 g substanțe ligninice/l prehidrolizat de rășinoase și faptul că prin spectroscopie în UV s-a constatat o concentrație în lignină solubilă de 0,6% iar în prehidrolizatul din plop tremurător o concentrație de 0,55.

După Sapotnițki (1979), prehidrolizatul din rășinoase conține 5–7 kg depuneri/m^3, iar după Fliate (1983), 4–5 kg/t lemn. În cazul prehidrolizei lemnului de fag efectuată la temperatura de 170°C, timp de 110 min, noi am constatat eliminarea la turația de 5 000 rot/min a 6,4 kg depuneri absolut uscate/m^3 prehidrolizat, ceea ce înseamnă eliminarea zilnică a 6,4 t depuneri sau 6,7 kg depuneri/t lemn.

Deoarece pînă în prezent s-a pus în evidență numai influența temperaturii și duratei prehidrolizei asupra formării și structurii depunerilor, se

constată că în aceleași condiții de prehidroliză (temperatură și durată) și hidromodulul poate influența structura depunerilor. Acest fapt pledează pentru respectarea unui regim optim și strict (temperatura, durata și hidromodul) la prehidroliză.

În concluzie, se poate afirma că depunerile de la prehidroliză sînt de natura ligninică și că aceste depuneri sînt rezultatul reacțiilor de policondensare dintre compușii fenolici, furfurol și derivații săi.

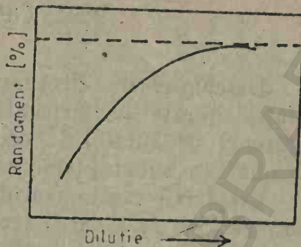


Fig. 64. Influența diluției asupra randamentului în biomasă.

În ceea ce privește posibilitatea de înlăturare a formării depunerilor la prehidroliză, nu se poate vorbi de o înlăturare totală ci numai de o diminuare, deoarece nu se pot suprima reacțiile de hidroliză și de policondensare a ligninei.

O altă grupă de substanțe din compoziția prehidrolizatelor o reprezintă acizii organici. În cazul lemnului de fag, ca rezultat al reacției de dezacetilare a acetatului de glucuronoxilan ia naștere acidul acetic, iar pe măsură ce avansează prehidroliza crește concentrația ionilor de hidrogen, care accelerează mai departe hidroliza celorlalte polizaharide din lemn.

Creșterea acidității este proporțională cu durata procesului de prehidroliză (fig. 57). Aciditatea finală a prehidrolizatorului la prehidroliza cu apă este, în general, în domeniul de pH = 3—4. În cazul lemnului de fag pH-ul optim la prehidroliză este de 3,5, pH la care corespunde și conținutul maxim de substanțe reducătoare (fig. 64).

Ca și leșiile sulfitice reziduale, prehidrolizatele nu pot fi utilizate ca atare în cultura drojdiilor furajere, fiind necesară îmbunătățirea calității lor biologice prin aplicarea unui complex de operațiuni de pregătire (diluare, suflare cu abur sau aer, neutralizare, adăugarea sărurilor nutritive etc.).

Prin metoda cromatografiei în gaz, în cazul prehidrolizatului din lemn de fag, s-a pus în evidență existența acidului acetic (0,03%), component asimilabil de drojdii, cît și prezența unor componente toxice cum ar fi acidul formic (0,4%), metanolul (0,15%) și acetona (0,07%).

3.5. PREGĂTIREA SOLUȚIILOR SULFITICE REZIDUALE ȘI A PREHIDROLIZATELOR PENTRU MULTIPLICARE

3.5.1. OPERAȚIUNEA DE OMOGENIZARE

Această operațiune este necesară în vederea preluării variațiilor de debite și uniformizării compozițiilor leșiilor sulfitice reziduale și a prehidrolizatelor provenite de la mai multe fierbătoare.

În scopul omogenizării leșiilor sulfitice reziduale și a prehidrolizatelor se recomandă introducerea în rezervoarele de colectare ale acestora a unui sistem de barbotare cu aer, care are ca efect secundar și înlăturarea compușilor volatili dăunători pentru dezvoltarea drojdiilor.

3.5.2. OPERAȚIUNEA DE DILUARE

Determinările efectuate demonstrează că atunci cînd se lucrează cu soluții diluate la fermentare, randamentul crește simțitor, fiind posibilă creșterea producției de drojdie furajeră și în consecință o valorificare mai rațională a substanțelor reducătoare totale din soluțiile reziduale (fig. 65).

Creșterea randamentului o dată cu mărirea gradului de diluție este o consecință a scăderii concentrației în substanțe inhibitoare și a efectului de autoinhibiție. Astfel, prin diluarea prehidrolizatului din lemn de fag, în raportul 1 : 2, s-a constatat scăderea accentuată a conținutului de substanțe reducătoare totale cu 58%, a conținutului în furfurol în medie cu 79% și a conținutului de zaharuri cu 60% (Stanciu, 1984). Pe măsură ce diluția crește, concentrația în substanțe inhibitoare scade, iar multiplicarea drojdiilor se face în condiții mai bune.

La concentrații mari în substanțe reducătoare, fenomenul de autoinhibiție al drojdiilor crește considerabil datorită creșterii biomasei. Prin creșterea biomasei, conținutul în substanțe inhibitoare rezultate în urma reacțiilor de metabolism atinge valori mari, iar fenomenul de autoinhibiție se amplifică. În cazul utilizării unor medii de multiplicare, cu concentrații scăzute în substanțe reducătoare, biomasa este relativ mică, iar fenomenul de autoinhibiție este practic neglijabil. Tot în acest sens trebuie arătat faptul că mărimea gradului de diluție al mediului de cultură favorizează pozitiv schimburile de substanțe între celule și mediul nutritiv prin fenomenul de osmoză. Astfel, se cunoaște faptul că în cazul mediilor de cultură hipertonice, adică cu presiune osmotică mai mare decît cea a citoplasmei celulelor de drojdii, apa iese din celule, protoplasma deshidratîndu-se, membrana celulară se zbîrcește, ducînd în final la o stare de plasmoliză a celulelor, de distrugere a acestora. Cînd mediul de cultură este hipotonic, fenomenele se petrec invers și apa intră în celule conferind acestora o turgescență, deci o stare normală dezvoltării celulelor.

Conținutul celular al celulelor tinere și bine dezvoltate este hipertonic față de mediul de cultură, avînd în cazul drojdiilor o presiune osmotică internă celulară de circa 4—8 bar, ceea ce favorizează trecerile de substanțe prin membrana celulară, datorită selectivității și semipermeabilității acesteia. De asemenea, tensiunea superficială a soluțiilor diluate crește o dată cu mărirea diluției, fiind cuprinsă între 52 și $64 \cdot 10^{-3}$ N/m, o tensiune superficială optimă multiplicării drojdiilor, întrucît mediile de cultură au în general o tensiune superficială cuprinsă între 57 și $63 \cdot 10^{-3}$ N/m (drojdiile se pot dezvolta și sub tensiuni superficiale de $45 \cdot 10^{-3}$ N/m, care sînt mortale pentru alte microorganisme) (Ștefan, Negoiță, 1967).

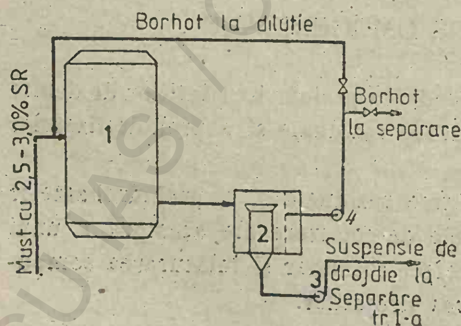


Fig. 65. Schema utilizării borhotului pentru diluarea la concentrația de zaharuri necesară:

1 — linul de fermentație; *2* — aparat de flotare; *3* — pompă pentru transportul suspensiei de drojdie la separare, treapta I; *4* — pompă pentru transportul borhotului la separare și diluarea mustului.

În cazul soluțiilor sulfitice reziduale, concentrația optimă pentru obținerea randamentului maxim variază între 1 și 1,5% substanțe reducătoare.

Operațiunea de diluare la concentrație de zahăr necesară se poate face după apă sau borhot chiar în linul de fermentare.

Borhotul utilizat pentru diluție are următoarele caracteristici: $pH = 4$, substanțe reducătoare = 0,13%, conținut de azot = 0,045%, P_2O_5 = 0,017%, temperatura = 30°C. Diluarea cu borhot conduce la stabilitatea fabricării drojdiilor furajere, la creșterea randamentului cu 15—20% și a conținutului de proteine brute cu 2% (Tatarskii, 1970).

Leșia bisulfitică se poate dilua numai în acele cazuri în care borhotul rezultat în urma fabricării drojdiilor furajere nu se utilizează la producerea concentratelor lignosulfonice (Rozmarin, Stanciu, 1985).

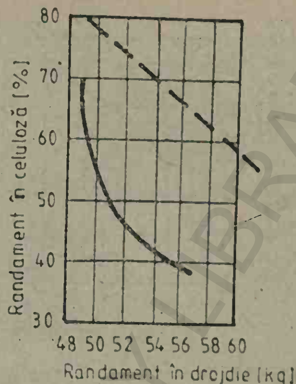


Fig. 66. Randamentul în drojdii la fierberea sulfit din leșii reziduale neinvertite:
- - - - leșii din fierberi de lemn de molid;
———— leșii din fierberi de lemn de foioase.

Posibilitatea de utilizare a mediilor cu conținut ridicat de zaharuri a fost cercetată de mai mulți autori. Aceștia au obținut rezultate pozitive în cursul dezvoltării pe leșii bisulfit a drojdiei *Candida diffluens*. Randamentul în biomasă absolut uscată este mai mare decît la drojdia *Torulopsis utilis* (de pe 1 m^3 mediu, într-o oră, s-au colectat 2 kg biomasă, s.u.) (fig. 66).

La prehidrolizate, problema concentrației în substanțe reducătoare pentru multiplicare este diferită în cazul prehidrolizatului din rășinoase și a prehidrolizatului din foioase, avînd în vedere conținutul diferit de acid acetic, care este net superior în cazul lemnului de foioase. Asimilarea acidului acetic depinde foarte mult de concentrația acestuia și de valoarea pH-ului din cuva de fermentare. Astfel, acțiunea toxică a acidului acetic se manifestă deja la o concentrație de 10 g/l la un $pH = 4{,}5$. Gradul cel mai mare de asimilare se realizează la concentrații de 4—6 g/l la $pH = 4{,}5$ și la concentrații de 8 g/l la $pH = 6{,}0$.

Deci pentru prehidrolizatele din foioase trebuie adoptată o concentrație în substanțe reducătoare la multiplicare de asemenea manieră încît să nu se depășească concentrația de 4—6 g/l acid acetic. Pentru prehidrolizatele din rășinoase nu se pun aceste probleme, lucrîndu-se, în general, cu o concentrație de 1,3—1,4% substanțe reducătoare.

3.5.3. OPERAȚIUNEA DE INVERSIE

Leșiile sulfitice și prehidrolizatele conțin întotdeauna o anumită cantitate de oligozaharide, fiind necesară, pentru a mări randamentul de zaharuri, o hidroliză acidă suplimentară (inversie) a acestora. Inversia este necesară deoarece drojdiile nu eliberează enzime extracelulare capabile să degradeze oligozaharidele la molecule mici asimilabile.

Conținutul mărit de zaharuri neinvertite și scăderea randamentului în drojdie se observă în cazul leșiilor provenite din fierberi de celuloză de mare randament și hemiceluloză, precum și la prehidrolizatele de la fabricarea celulozei sulfat (fig. 67). (Andreev, Brîzgalov, 1965).

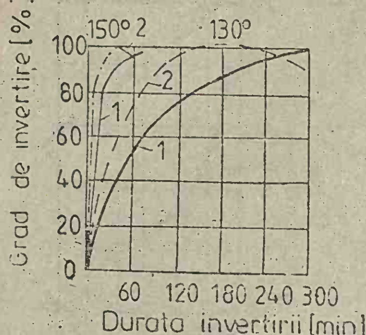


Fig. 67. Inversia leșiei cu acid sulfuric sub presiune: *1* — 0,1% H_2SO_4; *2* — 0,2% H_2SO_4

Invertirea leșiei sulfitice cu concentrații reduse de acid sulfuric (0,2—0,4%) la presiune atmosferică se face la o durată de 8—10 ore, pentru care sînt necesare un consum mare de căldură și instalații de capacitate corespunzătoare.

Reducerea duratei de inversie se poate realiza prin efectuarea inversiei sub presiune prin mărirea temperaturii (130...150°C). Astfel, creșterea temperaturii la 130°C la o concentrație a acidului sulfuric de 0,1% conduce la reducerea duratei de inversie a leșiilor cu baza de calciu de 3—4 ore, iar creșterea temperaturii la 150°C necesită o durată de inversie de numai 30 min.

Cercetările efectuate de noi au demonstrat că inversia soluțiilor reziduale cu baza de sodiu are loc cu rezultate bune în cazul conducerii procesului la temperatură ridicată (130...150°C), la concentrații de acid sulfuric de 0,35—0,45% și la o durată de maximum două ore.

Inversia prehidrolizatelor din lemn de rășinoase și foioase a fost abordată de diverși cercetători (Brabec, 1967, Li San Djon, 1972, Sahanova, 1975, Filipov, 1977, Orlov, 1977, Chupka, 1977, Dshan, 1978).

Pentru prehidrolizatul din lemn de fag a fost efectuat un studiu privind influența unor factori mai importanți în procesul de inversie (concentrațiile acidului, %, temperatura, °C și durata procesului, min), în vederea determinării condițiilor optime în care se poate obține cantitatea maximă de zaharuri (Stanciu, 1984). Dat fiind că puterea hidrolitică diferă de la un acid la altul, s-a considerat util să se ia în studiu doi acizi diferiți: acidul clorhidric și acidul sulfuric (fig. 68).

Pentru obținerea datelor experimentale s-a utilizat un plan experimental centrat compus rotitor. În tabelul 39 se prezintă codificarea variabilelor pentru acest proiect, de unde se poate aprecia și mărimea domeniului experimental.

Tabelul 39

Codificarea variabilelor

Variabila	(Cod)	− 1,682	− 1	0	+1	+1,682
Concentrația acidului, %	(X_1)	0,26	0,40	0,60	0,80	0,94
Temperatura, °C	(X_2)	66	80	100	120	134
Durata, min	(X_3)	86	100	120	140	154

Pentru fiecare experiență, s-au determinat după inversie conținutul de zaharuri (Z) și conținutul de furfurol (F). Cu ajutorul datelor experimentale obținute s-au determinat coeficienții și ecuațiile de regresie care sînt reprezentate în figurile 69.

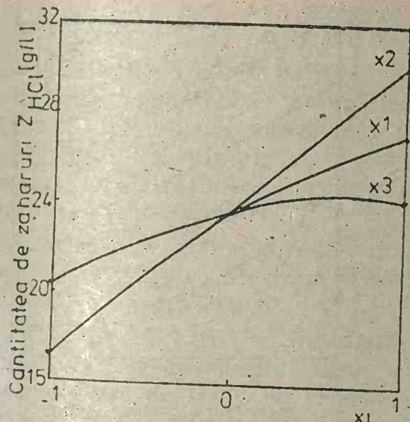


Fig. 68. Variația conținutului de zaharuri cu variația parametrilor studiați în cazul utilizării acidului clorhidric (fiecare curbă reprezintă variația conținutului de zaharuri, funcție de parametrul specificat pentru condițiile centrate a celorlalți doi parametri).

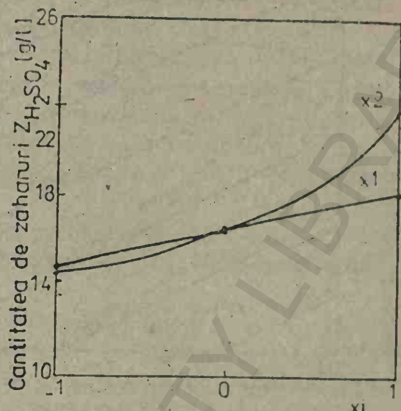


Fig. 69. Variația conținutului de zaharuri cu variația parametrilor studiați în cazul utilizării acidului sulfuric (fiecare curbă reprezintă variația conținutului de zaharuri funcție de parametrul specificat pentru condițiile centrate a celorlalți doi parametri).

Din analiza figurilor 68 și 69 se constat că conținutul de zaharuri crește o dată cu creșterea concentrației acidului și temperaturii, cea mai mare influență înregistrîndu-se în cazul acidului clorhidric. Acest fapt se explică prin puterea hidrolitică mai mare a acidului clorhidric în comparație cu acidul sulfuric. Durata procesului nu influențează hidroliza, decît în cazul acidului clorhidric.

În ceea ce privește conținutul de furfurol, din fig. 70 și fig. 71 se constată de asemenea creșterea acestuia, cu concentrația acidului și temperatura, și scăderea cu timpul datorită reacțiilor de descompunere.

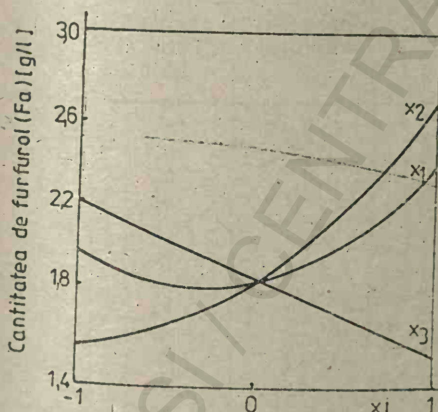


Fig. 70. Variația conținutului de furfurol cu variația parametrilor studiați, în cazul utilizării acidului clorhidric (fiecare curbă reprezintă variația conținutului de furfurol pentru condițiile centrate ale celorlalți doi parametri).

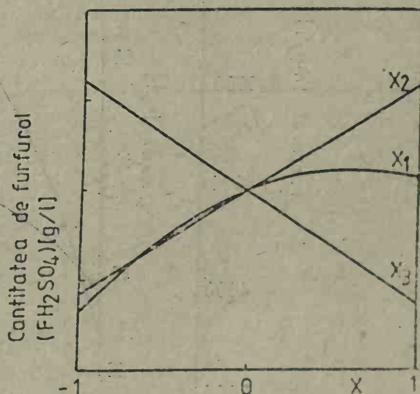


Fig. 71. Variația conținutului de furfurol cu variația parametrilor studiați, în cazul utilizării acidului sulfuric (fiecare curbă reprezintă variația conținutului de furfurol funcție de parametrul specificat pentru condițiile centrate ale celorlalți doi parametri).

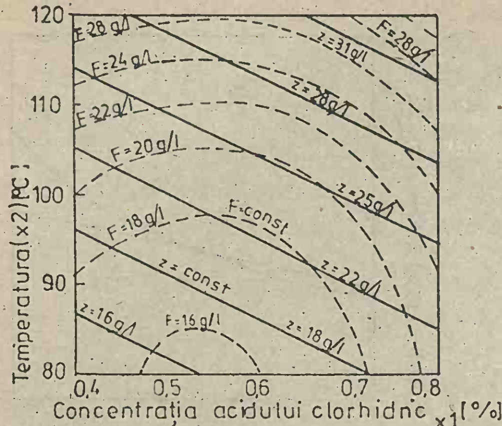


Fig. 72. Variația conținutului de zaharuri și furfurol în planul experimental al concentrației acidului clorhidric și tempreaturii (durata 120 minute).

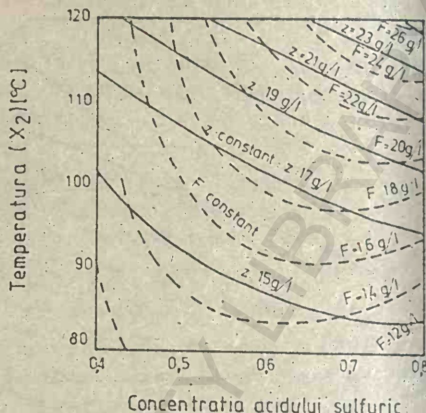


Fig. 73. Variația conținutului de zaharuri și furfurol în planul experimenral al concentrației acidului sulfuric și temperaturii (durata de 120 minute).

Ca și în cazul zahararuilor, acțiunea hidrolitică cu formarea furfurolului este mai intensă la utilizarea acidului clorhidric (fig. 72).

În fig. 73 și 74 sînt reprezentate variațiile conținutului de zaharuri și furfurol în planul concentrației și temperaturii pentru cei doi acizi utilizați.

Se constată că direcția cu cea mai mare creștere a conținutului de zaharuri este aproximativ egală în cazul celor doi acizi. Este însă o diferență

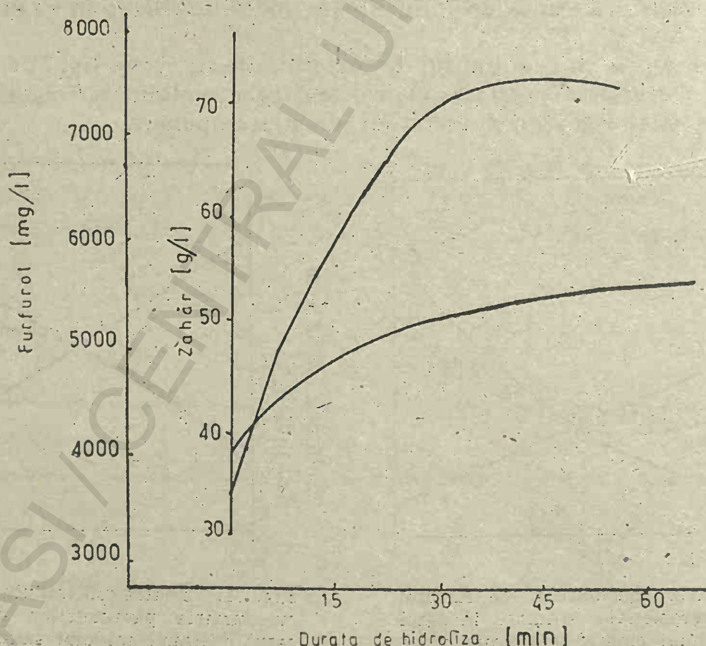


Fig. 74. Variația conținutului de zaharuri și de furfurol, cu durata în cazul inversiei prehidrolizatului cu acid sulfuric (concentrație 0,65% și temperatura de 105°C).

de pantă, cea mai mare creştere obţinîndu-se în cazul acidului clorhidric. Concluzia anterioară este valabilă şi în cazul furfurolului, ceea ce constituie o dovadă că reacţiile de formare a zaharurlor şi furfurolului sînt intim legate.

Forma generală a suprafeţelor reliefează imposibilitatea determinării unor condiţii optime, decît dacă se impune o restricţie asupra conţinutului de furfurol. De exemplu, dacă admitem conţinutul maxim de furfurol de 2 g/l, atunci concentraţia maximă în zaharuri poate să fie de 25 g/l, în cazul utilizării acidului clorhidric.

Condiţiile mai sigure de realizare a concentraţiilor maxime în cazul utilizării acidului sulfuric se plasează în jurul valorilor de 0,65% concentraţie şi 105°C temperatură.

Analizînd variaţia conţinutului de zaharuri şi de furfurol cu durata în cazul inversiei prehidrolizatului cu acid sulfuric (concentraţia 0,65%), la tempeartura de 105°C, se recomandă inversia la o durată minimă de 15 min, care asigură o creştere a conţinutului de zaharuri cu 9,5 g/l şi o creştere a conţinutului de furfurol de numai 2,4 g/l.

Pentru prehidrolizatul din lemn de plop se recomandă inversia cu acid sulfuric 1% la temperatura de 100°C (Li San Djon, 1972, Filipov, 1977, Dshan, 1978).

La inversia prehidrolizatului din răşinoase (pin şi zadă), la temperatura de 140°C, şi cu acid sulfuric de 0,5% concentraţie, cantitatea de depuneri creşte de la 0,06 la 0,55 g/l în cazul prehidrolizatului din pin şi de la 0,05 la 0,61 g/l, în cazul prehidrolizatului din zadă (tabelul 40) (Orolv, Tarasynk, 1978).

Tabelul 40

Variaţia caracteristicilor prehidrolizatului din lemn de pin şi zadă în cazul inversiei cu acid sulfuric

(Orlov, 1978)

Specia de lemn	Durata inversiei, min	Substanţe reducătoare, %	Dextrine, %	Substanţe bromurabile, %	Substanţe în suspensie, %	Depuneri, g/l
Pin	0	2,0	2,0	0,86	0,5	0,06
	20	3,5	0,4	0,84	2,0	0,10
	30	3,8	0,05	0,80	2,6	0,32
	40	3,82	—	0,75	2.7	0,50
	50	3,78	—	0,78	2,7	0,55
Zadă	0	2,8	2,9	0,84	0,8	0,05
	30	5,0	0,6	0,80	2,8	0,10
	40	5,4	0,2	0,80	3,0	0,50
	45	5,6	0,08	0,75	3,6	0,55
	50	5,55	—	0,75	3,6	0,60
	60	5,5	—	0,80	3,5	0;61

În cazul valorificării prehidrolizatelor pe drojdii, se recomandă o durată de inversie minimă, care să conducă la hidroliza oligozaharidelor, la obţinerea unui conţinut maxim de zaharuri asimilabile şi minim de furfurol.

Operaţiunea de inversie nu este o operaţiune tehnologică simplă. Oportunitatea introducerii inversiei în fluxul tehnologic de pregătire a soluţiei

ce se supune prelucrării chimice trebuie stabilită corelînd creșterea de substanțe reducătoare cu creșterea producției de drojdie (fig. 75).

Producția suplimentară de drojdie trebuie să fie suficient de mare pentru a justifica consumurile de energie și materiale necesare inversiei.

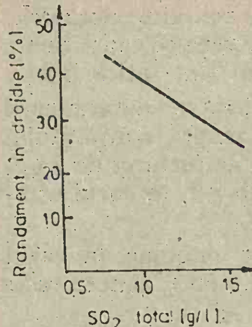


Fig. 75. Variația randamentului în drojdie funcție de conținutul total de dioxid de sulf.

3.5.4. ÎNDEPĂRTAREA COMPUȘILOR VOLATILI DĂUNĂTORI DIN LEȘIILE SULFITICE REZIDUALE ȘI DIN PREHIDROLIZATE

Calitatea mediului de multiplicare este determinată nu numai de compușii chimici care influențează pozitiv dezvoltarea celulelor de drojdie, ci și de conținutul substanțelor care inhibă dezvoltarea drojdiilor.

În leșiile sulfitice compușii dăunători sînt: dioxidul de sulf liber și sulfiții acizi, furfurolul, sărurile de cupru și arsen (provenite din arderea piritei), ionul de fluor.

Tabelul 41 prezintă influența unor substanțe organice prezente în soluțiile reziduale de la fabricarea celulozelor asupra randamentului în drojdie furajeră (Holkin, 1989).

Tabelul 41

Influența unor compuși organici asupra randamentului în drojdie
(Holkin, 1989)

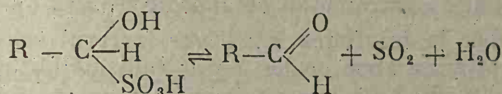
Componentul	Concentrație, %	Acțiunea inhibitoare
Furfurol	0,03	Reducerea activității fermentative
	0,06	Reducerea randamentului cu 10—30%
	0,10	Reducerea randamentului cu 30—40%
Alcool furfurilic	0,03	Reducerea randamentului cu 20%
	0,10	Reducerea randamentului cu 20%
Hidroximetilfurfurol	0,10	Reducerea randamentului cu 10%
Acid formic	0,10	Reducerea randamentului cu 10%
Acid levulinic	0,35	Reducerea productivității cu 30—45%
Cimol	0,001	Reducerea randamentului cu 5—10%
Fenoli volatili	0,001	Reducerea randamentului cu 10%
Pimen	0,005	Reducerea activității fermentative
Formaldehidă	0,001	Reducerea randamentului cu 10%
Substanțe lignohumice	0,20	Reducerea randamentului cu 20—35%
Compușii azotului	0,15	Reducerea randamentului cu 10—20%

Principalul component nedorit din leșiile sulfitice este dioxidul de sulf liber. Îndepărtarea dioxidului de sulf se impune din următoarele motive:

— dioxidul de sulf are o acțiune inhibitoare directă asupra dezvoltării drojdiilor;

— dioxidul de sulf formează combinații cu produsele intermediare ale reacțiilor ce au loc prin fermentare (astfel, dioxidul de sulf blochează acetaldehida cu rol esențial în sinteza proteinei celulei de drojdie);

— prin îndepărtarea dioxidului de sulf se deplasează echilibrul sistemului dioxid de sulf-compuși carbonil bisulfitici, cu eliberarea potențială a compușilor carbonilici din forma combinată:



$$R-C\begin{matrix}OH\\H\\SO_3H\end{matrix} \rightleftharpoons R-C\begin{matrix}O\\ \\H\end{matrix} + SO_2 + H_2O$$

Primul mijloc de îndepărtare din leșie a substanțelor volatile este degazarea aburului din fierbătoare. Cu cît este mai adîncă gazarea aburului, cu atît va rămîne mai puțin dioxid de sulf în leșie (fig. 76).

Cel mai simplu procedeu de îndepărtare a dioxidului de sulf este suflarea leșiei sulfitice cu aer. Se recomandă suflarea leșiei timp de o oră la temperatura de 80°C, cu un consum de aer de 0,4—0,5 m^3/m^3 din aria secțiunii rezervorului. După B u e v s k o i (1951) consumul de aer la insuflare reprezintă circa 5 $m^3/h/m^3$ leșie.

Insuflarea cu aer conduce la scăderea temperaturii, iar aceasta, la rîndul ei, mărește solubilitatea dioxidului de sulf. Suflarea cu aer este rațională la temperatura leșiei sulfitice de minimum 80°C și este indicată a se face înaintea fazei de neutralizare.

Prin suflare cu aer se îndepărtează numai dioxidul de sulf. Procedeul cel mai eficient de îndepărtare a componentelor volatile toxice este procedeul de tratare cu abur în coloane cu talere sau cu umplutură, cunoscut sub numele de desulfitare. Desulfitarea cu abur în coloane garantează nu numai eliminarea completă a întregii cantități de dioxid de sulf liber ci și parțial a dioxidului de sulf labil legat mai ales în complexul zaharo-bisulfitic. Desulfitarea prealabilă a soluțiilor reziduale sulfit conduce prin reducerea acidității la scăderea consumului de lapte de var pentru neutralizare.

Cercetările și experiența practică au arătat că eficiența desulfitării depinde nu de concentrația în soluție a dioxidului de sulf și a bazei, ci de valoarea raportului dintre dioxidul de sulf liber și dioxidul de sulf legat. Dacă acest raport este mai mic de 2, atunci, prin insuflarea cu abur, nu se poate îndepărta mai mult de 60% din dioxidul de sulf conținut în soluție (fig. 77).

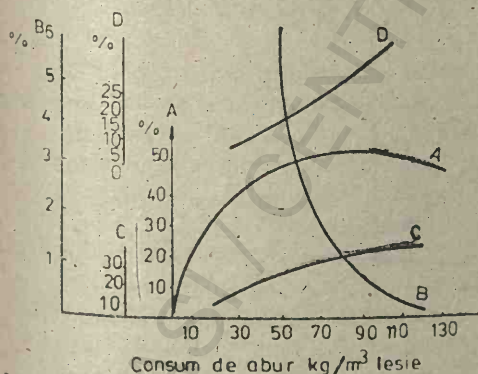


Fig. 76. Consumul de abur la desulfitarea leșiilor sulfitice reziduale:

A — % SO_2 îndepărtat; *B* — concentrația SO_2 (%) în condensat; *C* — % acizi organici îndepărtați (exprimați în CH_3COOH); *D* — conținutul de SO_2 liber în condens, în % din SO_2 total.

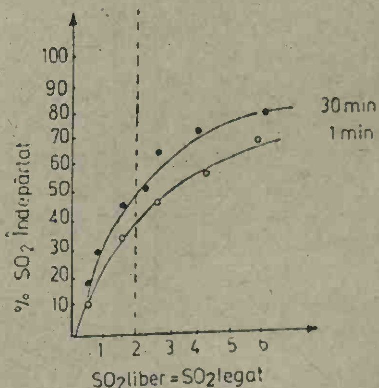


Fig. 77. Eficiența desulfitării, funcție de raportul dintre conținutul de bioxid de sulf liber și legat.

Pentru fiecare tip de soluţie care are un anumit raport între dioxidul de sulf liber şi legat, există o anumită eficienţă de îndepărtare a dioxidului de sulf, prin însuflare cu abur, care nu poate fi depăşită nici prin mărirea duratei de însuflare, nici a consumului de abur la această operaţie.

Consumul de abur la însuflarea leşiei este factorul cel mai important. Consumul specific optim de abur pentru leşiile sulfitice obţinute din fierberi normale reprezintă 40—50 kg/m³ leşie. Prin aceasta se îndepărtează pînă la 50% din compuşii dioxidului de sulf (fog. 78).

Fabricile de drojdie furajeră din ţara noastră care utilizează ca substrat leşiile sulfitice reziduale sînt echipate cu coloane de desulfitare cu talere tip jet-transfer, care au următoarele caracteristici principale :

— diametrul — 1 200 mm :

— înălţimea — 3 200 mm ;

— numărul talerelor jet-transfer — 29 ;

— suprafaţa talerelor — 30 m² ;

— debitul de soluţie — 5—50 m³/h.

Principalul component nedorit în prehidrolizatul din lemn de foioase este furfurolul, care trebuie îndepărtat pînă la nivelul maxim de 0,35 g/l. În acest sens s-a analizat reducerea conţinutului de furfurol din prehidrolizatul din lemn de fag prin metoda suflării cu abur. În fig. 79 este redată variaţia caracteristicilor fizico-chimice ale prehidrolizatului în urma procesului de suflare cu abur (3 bar).

După o durată de însuflare cu abur de 18 ore s-a constatat :

— creşterea *p*H-ului de la 3,55 la 3,9, ca urmare a eliminării parţiale a componenţilor volatili acizi (acidul acetic şi formic) ;

— scăderea conţinutului de zahăr de la 40 g/l la 15 g/l (o scădere de 62,5%) ca urmare a diluării cu condens a prehidrolizatului.

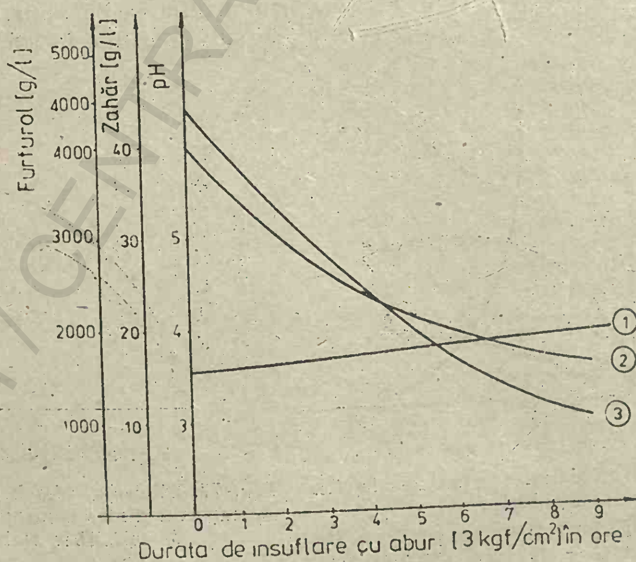


Fig. 78. Variaţia caracteristicilor fizico-chimice ale prehidrolizatului în urma procesului de suflare cu abur.

Suflarea cu abur nu poate fi luată în considerare ca unică metodă de îndepărtare a furfurolului din prehidrolizat, recomandîndu-se operaţiunea de antrenare cu abur, care este o metodă mult mai eficientă. Curbele de tensiune a vaporilor de apă şi furfurol arată că furfurolul este mult mai puţin volatil decît apa.

Cu toate acestea, faza gazoasă care se află deasupra soluţiei de furfurol este mai bogată în furfurol decît soluţia iniţială. Pe această proprietate a sistemului apă-furfurol se bazează metoda de extracţie a furfurolului din soluţiile apoase prin antrenare cu abur. În urma antrenării cu abur, practic furfurolul poate fi îndepărtat complet (tabelul 42).

Tabelul 42

Influenţa operaţiunii de antrenare cu abur asupra conţinutului de furfurol, substanţe reducătoare totale (SRT) şi zahăr din prehidrolizatul din lemn de fag

Operaţiunea	Furfurol g/l	SRT g/l	Zahăr g/l
Prehidrolizat iniţial	3,68	85,20	43,29
Prehidrolizat după operaţiunea de antrenare cu abur	—	32,21	15,98

În ultimul timp, metoda cea mai des utilizată pentru îndepărtarea furfurolului constă în autoevaporarea sub vacuum care asigură şi răcirea prehidrolizatului la temperatura de 36...40°C. Coloanele de autoevaporare sub vacuum permit reducerea conţinutului de furfurol în proporţie de 30—40%, fapt care impune montarea în serie a coloanelor în vederea eliminării furfurolului în proporţie de cel puţin 80%.

3.5.5. POSIBILITĂŢI DE DIMINUARE ŞI DE ÎNLĂTURARE A DEPUNERILOR LIGNINICE DIN PREHIDROLIZATE

În valorificarea prehidrolizatelor şi mai ales a acelora provenind din lemn de foioase o problemă deosebită o reprezintă depunerile ligninice.

Diminuarea depunerilor ligninice trebuie realizată începînd cu faza de prehidroliză (Rozmarin, Stanciu, Ciobanu, Herczegh, 1980).

O metodă de diminuare a depunerilor constă în adăugarea în apa de la prehidroliză (0,04—0,05%) sau în prehidrolizate (0,02—0,2%) de borhoturi lignosulfonice (Rozmarin, Stanciu, Ciobanu, 1986, 1989).

Utilizarea acizilor lignosulfonici se bazează pe unele proprietăţi fizice, ca de exemplu pe hidrofilia acestora, ceea ce îi indică pentru folosirea lor ca agenţi de dispersie şi coloizi protectori (Rozmarin, 1984).

Introducerea acizilor lignosulfonici la prehidroliză nu influenţează fierberea, calitatea prehidrolizatului şi a celulozei şi permite inversia prehidrolizatului la suprapresiune (la inversia la suprapresiune de 2,5—3,0 bar şi temperatura de 130...140°C s-a constatat o durată de inversie mai mică decît inversia la presiune atmosferică şi temperatura de 100°C, dar o cantitate mult mărită de depunere cu aderenţă puternică pe pereţii aparaturii). Adău-

Tabelul 43

Rezultatele obținute la reducerea depunerilor ligninice din prehidrolizate prin utilizarea auxiliarului BEROL VL-53

Adaosul de aditivi față de lemn a.u.	Specia de lemn	Condiții de prehidroliză					Substanțe coloidale, % față de lemn a.u.
		Hidromodulul	pH	Durata de încălzire, min	Temperatura la palier, °C	Durata la palier, min	
Fără adaos	Fag	1 : 3,5	4,5	65	179	75	2,4
0,1% BEROL VL-53	Fag	1 : 3,5	4,5	65	179	75	1,4
0,25% BEROL VL-53	Fag	1 : 3,5	4,5	65	179	75	0,20
Fără adaos	Mesteacăn	1 : 3,5	4,5	65	179	75	1,60
0,25% BEROL VL-53	Mesteacăn	1 : 3,5	4,5	65	179	75	0,15
Fără adaos	Stejar + arțar	1 : 3,5	4,5	65	179	75	1,90
0,25% BEROL VL-53	Stejar + arțar	1 : 3,5	4,5	65	179	75	0,41
Fără adaos	Stejar + arțar	1 : 5	7,0	60	166	60	0,52
0,25% BEROL VL-53	Stejar + arțar	1 : 5	7,0	60	166	60	0,08

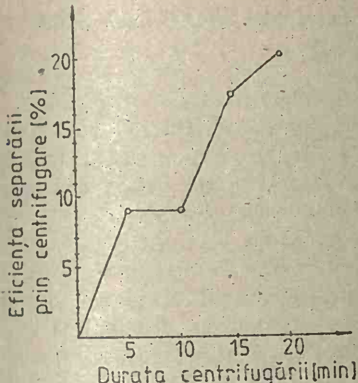


Fig. 79. Eficiența separării prin centrifugare a depunerilor ligninice, funcție de durată la o turație constantă de 1 000 ture/minut.

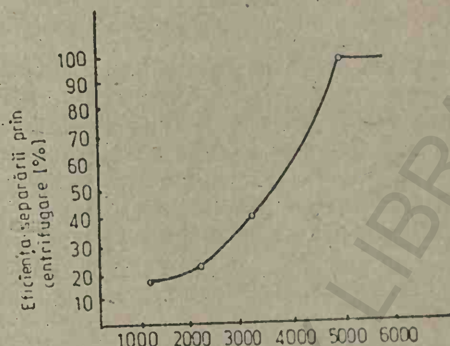


Fig. 80. Eficiența separării prin centrifugare a depunerilor ligninice, funcție de turație la o durată constantă de 15 minute.

garea de produși lignosulfonici în apa de la prehidroliză permite efectuarea inversiei prehidrolizatului la suprapresiune. Ca urmare a acestui fapt, se reduce sensibil cantitatea de depuneri pe conducte și în invertoare, determinînd formarea unei suspensii fin dispersate care nu se mai depune.

Firma BEROL-AB, Suedia, a pus la punct un produs tensioactiv, Berol VL-53, pentru diminuarea depunerilor din prehidrolizat.

În tabelul 43 se prezintă rezultatele obținute prin utilizarea acestui auxiliar chimic.

O altă metodă de diminuare a conținutului de depuneri ligninice o reprezintă reducerea în stare izoelectrică a particulelor coloidale din prehidrolizat, precipitarea și depunerea acestora urmată de operațiunea de inversie (Saponițki, 1979). Aatfel, în cazul prehidrolizatului din lemn de rășinoase, se propune neutralizarea acestuia cu hidroxid de sodiu la un $pH = 5{,}5-5{,}7$, cînd se realizează starea izoelectrică a particolelor coloidale. Pentru prehidrolitazele din lemn de foioase (mesteacăn, plop) punctul izoelectric este atins la $pH = 6{,}0$.

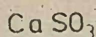
În cazul prehidrolizatului din lemn de fag s-a studiat înlăturarea depunerilor ligninice prin operațiunea de separare centrifugală, urmărindu-se eficiența acestuia în funcție de durată, la o turație constantă de 1 000 rot/min, și funcție de turație la o durată constantă de 15 min (fig. 79 și 80) (Stanciu, 1984),

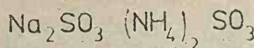
După cum se poate constata din fig. 79, la durata de centrifugare de 5—10 min, eficiența separării este minimă (9%), ea crescînd cu durata.

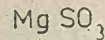
Din fig. 80 se constată că eficiența separării la o durată constantă este direct proporțională cu turația, pînă la o turație de 5 000 rot/min. Eficiența separării este maximă (80—100%) la o turație de 4 500—5 000 rot/min.

3.5.6. ASPECTE PRIVIND PREGĂTIREA SOLUȚIILOR SULFITICE REZIDUALE PROVENITE DE LA FIERBERILE CU BAZE SOLUBILE

Pregătirea soluțiilor sulfitice reziduale provenite de la fierberile cu baze solubile (sodiu, amoniu) sau semisolubile (magneziu) necesită o operațiune suplimentară pentru scăderea concentrației monosulfitului.







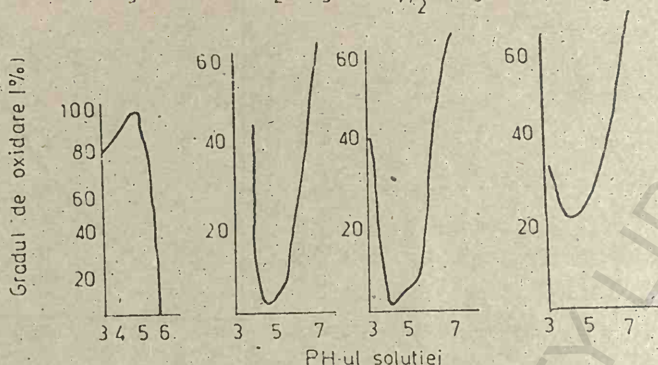


Fig. 81. Oxidarea cu aer a sulfiţilor din diverse leşii sulfitice: *A* — cota parte a sulfitului oxidat; *B* — *p*H-ul soluţiei.

Dioxidul de sulf se găseşte în leşiile sulfit sub trei forme: liber, legat aldehid-bisulfitic şi sub formă de monosulfit.

În leşiile sulfitice cu baze solubile monosulfitul reprezintă forma fundamentală de legare a dioxidului de sulf din soluţie.

Deşi monosulfitul nu influenţează negativ procesele biochimice, chiar la concentraţii mari, totuşi, datorită echilibrului dinamic dintre monosulfit şi bisulfit, primul trece în al doilea la valori ale *p*H-ului care sînt proprii proceselor de prelucrare biochimică, formînd cu zaharurile compuşi aldehid-bisulfitici şi în felul acesta zaharurile nu sînt complet utilizate.

Se impune alături de desulfitare o serie de operaţiuni suplimentare de îndepărtare a cantităţilor excesive de monosulfit. Acest fapt se poate realiza pe două căi:

— prin oxidarea monosulfitului în sulfat sau trecerea sulfitului într-o formă insolubilă. Oxidarea se poate face prin suflare cu aer. S a p o t n i ţ k i şi G l u s c e n k o au demonstrat că soluţiile sulfiţilor de sodiu, amoniu şi magneziu, prin suflare cu aer pot fi oxidate într-o anumită măsură în sulfaţii respectivi. Suflarea cu aer trebuie să se facă la valoarea *p*H-ului mai mică de 4 sau mai mare de 5. În limitele de *p*H = 4—5 sulfiţii solubili nu pot fi oxidaţi (fig. 81).

Experimentările efectuate de noi au demonstrat în cazul soluţiilor sulfitice provenite de la fierberile cu baza de sodiu că randamentul maxim de reducere a concentraţiei monosulfitului se realizează la *p*H = 3,3 (tabelul 44);

— prin neutralizarea monosulfitului cu lapte de var. În acest caz se formează sulfitul de calciu insolubil care poate fi îndepărtat uşor prin decantare.

Tabelul 44

Reducerea concentraţiei monosulfitului funcţie de valoarea *p*H-ului

*p*H	Reducerea concentraţiei monosulfitului, % (valori medii)		
	Durata aerării		
	1 h	2 h	3 h
3,3	58	71	80
3,5	38	56	65
4,2	76	80	80

3.5.7. NEUTRALIZAREA SOLUȚIILOR SULFITICE REZIDUALE ȘI A PREHIDROLIZATELOR

Soluțiile bisulfitice reziduale desulfitate, deși au un conținut mai mic de dioxid de sulf, totuși nu pot fi folosite pentru multiplicare, din cauza acidității mari și a lipsei de substanțe furnizoare de azot, fosfor, potasiu și magneziu, care sînt necesare formării proteinelor. De aceea, pentru a putea fi folosite, aceste soluții se neutralizează pînă la un anumit *p*H, prin reducerea acidității și apoi se tratează cu substanțe care furnizează în timpul fermentației elementele chimice necesare înmulțirii și dezvoltării normale a drojdiilor, respectiv formării proteinelor.

Industrial, neutralizarea soluțiilor sulfitice reziduale se poate realiza în mai multe moduri, și anume :

— cu lapte de var urmată de tratarea cu substanțe nutritive ;
— cu amoniac (soluție 25%) ;
— combinată cu lapte de var și amoniac.

Procedeul de neutralizare se alege în funcție de calitatea soluțiilor reziduale desulfitate, respectiv de gradul lor de desulfitare și aciditate.

3.5.7.1. NEUTRALIZAREA CU LAPTE DE VAR

Această metodă de neutralizare se aplică atunci cînd soluțiile reziduale au un *p*H mai mare de 3,5 și sînt bine desulfitate. Ea nu este indicată cînd *p*H-ul este scăzut, deoarece în acest caz cantitatea de $Ca(OH)_2$ folosit pentru neutralizare este mare, ceea ce face să crească mult concentrația de ioni de calciu, în soluția neutralizată. O concentrație mare în ionii de calciu diminuează randamentul în drojdie și favorizează dezvoltarea altor microorganisme. După unii cercetători excesul de calciu are efecte negative asupra vitezei de multiplicare prin : efectul inhibitor asupra enolazei, fosfopiruvatchinazei ; încetinirea reacțiilor de oxido-reducere realizate prin intermediul ciclului acizilor tricarboxilici, datorită formării acidului citric (Vasilescu, 1961, Saru 1973). Totodată, folosirea unei cantități mari de hidroxid de calciu duce la formarea, în timpul neutralizării, a sulfitului și a sulfatului de calciu, care nu se decantează ușor, iar în timpul separării drojdiilor, în separatoare, provoacă înfundarea duzelor. Datorită acestor considerente trebuie să se cunoască bine caracteristicile soluțiilor reziduale desulfitate.

În fig. 82 se prezintă schema unei instalați de neutralizare cu lapte de var.

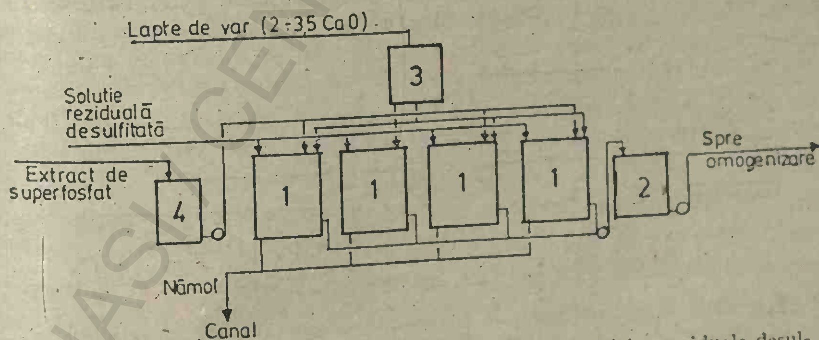
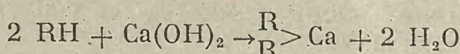


Fig. 82. Schema instalației de neutralizare a soluției sulfitice reziduale desulfitate cu lapte de var :
1 — rezervor de neutralizare ; *2* — rezervor de soluție neutralizată decantată ; *3* — rezervor cu lapte de var ; *4* — rezervor cu extract de superfosfat.

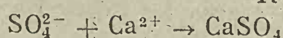
Neutralizarea cu hidroxid de calciu se face cu lapte de var cu o concentrație de 2—3,5% CaO. Laptele de var nu se introduce dintr-o dată, ci în timp, în porțiuni mici, pentru a se evita măriri locale de alcalinitate care ar putea favoriza transformarea zaharurilor în acizi uronici.

În general, soluțiile reziduale sînt aduse după neutralizare la un *p*H cuprins între 4,0 și 5.5. Aceste limite constituie *p*H-ul de lucru în funcție de procedeul de fabicare a drojdiilor.

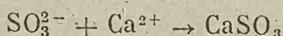
După adăugarea laptelui de var se continuă agitarea puternică pentru omogenizarea mediului și definitivarea reacțiilor de formare a sărurilor de calciu, respectiv a lignosulfonaților, sulfiților, sulfaților și formiaților de calciu:



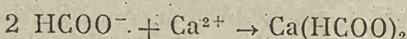
$$2\ RH + Ca(OH)_2 \rightarrow {}^{R}_{R}{>}Ca + 2\ H_2O$$



$$SO_4^{2-} + Ca^{2+} \rightarrow CaSO_4$$



$$SO_3^{2-} + Ca^{2+} \rightarrow CaSO_3$$



$$2\ HCOO^- + Ca^{2+} \rightarrow Ca(HCOO)_2$$

Consumul de lapte de var folosit la neutralizare exprimat în oxid de calciu este funcție directă de aciditatea soluțiilor reziduale desulfitate și variază între limite destul de largi (1,2—2,2 kg CaO/m³ soluție reziduală).

În literatura de specialitate se insistă asupra importanței neutralizării cu lapte de var a soluțiilor reziduale de la fierberile cu baze solubile. Din datele găsite rezultă că la neutralizarea cu lapte de var, la cultivarea drojdiilor pe o soluție cu baza de amoniu, se realizează randamente superioare față de neutralizarea cu amoniac.

3.5.7.2. NEUTRALIZAREA CU AMONIAC (SOLUȚIE 25%)

Metoda de neutralizare cu amoniac soluție 25% se utilizează atunci cînd *p*H-ul soluțiilor reziduale desulfitate este cuprins între 3,0 și 3,5. Metoda nu poate fi aplicată atunci cînd concentrația în zaharuri este mai mică de 18 g/l, chiar dacă *p*H-ul este cuprins între 3,0 și 3,5, deoarece la acest caz cantitatea de amoniac raportată la cantitatea de zaharuri este prea mare, fapt care ar putea favoriza infectarea drojdiilor în timpul fermentării. Ea se aplică bine atunci cînd concentrația soluțiilor reziduale în zaharuri este mai mare de 20 g/l, iar *p*H-ul este de 3,2 ± 0,2.

Schema instalației de neutralizare cu amoniac este asemănătoare cu cea a neutralizării cu lapte de var și este redată în fig. 83.

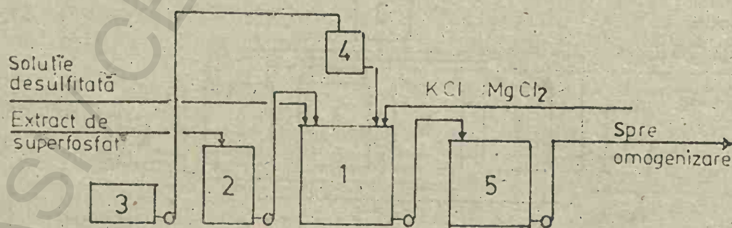


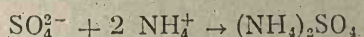
Fig. 83. Schema instalației de neutralizare a soluției sulfitice reziduale desulfitate cu amoniac:

1 — rezervor de neutralizare; *2* — rezervor de colectare a extractului de superfosfat; *3* — rezervor de amoniac; *4* — rezervor măsurător pentru amoniac; *5* — rezervor de soluție neutralizată decantată.

Ca urmare a tratării cu amoniac, compoziția chimică a soluțiilor reziduale se schimbă, în sensul că o parte însemnată din acizii care se găsesc în soluțiile sulfitice reziduale (acizi lignosulfonici, sulfuros, sulfuric, formic, acetic etc.) sînt transformați în sărurile lor de amoniu, conform reacțiilor:



$$R - H + NH_4OH \rightarrow R - NH_4 + H_2O$$



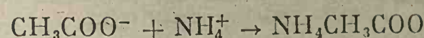
$$SO_4^{2-} + 2\ NH_4^+ \rightarrow (NH_4)_2SO_4$$



$$SO_3^{2-} + 2\ NH_4^+ \rightarrow (NH_4)_2SO_3$$



$$HCOO^- + NH_4^+ \rightarrow NH_4HCOO$$



$$CH_3COO^- + NH_4^+ \rightarrow NH_4CH_3COO$$

Metoda de neutralizare cu amoniac prezintă avantajul că realizează atît neutralizarea soluțiilor reziduale cît și îmbogățirea lor în săruri de amoniu, ca urmare a reacțiilor menționate, fapt care face ca după neutralizare să nu mai fie necesară introducerea de alte săruri de amoniu în soluțiile reziduale. În plus, prin neutralizarea cu amoniac se elimină formarea sărurilor insolubile, care se produc în cazul neutralizării cu hidroxid de calciu sub formă de sulfiți și sulfați de calciu (Fedoseva, Mironova, 1967).

Cel mai mare avantaj al neutralizării cu apă amoniacală este creșterea conținutului de proteine brute și reale și a randamentului în biomasă.

Prin utilizarea pentru drojdii a leșiilor sulfitice provenite de la fierberile cu baze solubile, în particular cu baza amoniu, este rațional ca neutralizarea să se facă cu lapte de var, deoarece în acest caz ca urmare a schimbului de cationi se formează sulfitul de calciu, insolubil, ușor de îndepărtat prin decantare. Această metodă prezintă dezavantajul că soluția neutralizată obținută are un conținut variabil în azot, ca urmare a *p*H-ului variabil al soluțiilor reziduale provenite de la diferite sorturi de celuloză, fapt care îngreuiază mult conducerea procesului de fermentare. Cu toate acestea, metoda de neutralizare cu amoniac poate da rezultate bune, dacă înainte de neutralizare soluțiile reziduale au fost bine omogenizate în scopul eliminării variațiilor de *p*H.

3.5.7.3. NEUTRALIZAREA COMBINATĂ CU LAPTE DE VAR ȘI AMONIAC

Metoda de neutralizare combinată este aplicată la soluțiile sulfitice reziduale care au un *p*H mai mic de 3,3, dînd rezultate mult mai bune decît metodele descrise atît în ceea ce privește calitatea soluției neutralizate cît și conducerea procesului de fermentare. Schema unei instalații de neutralizare combinată pentru soluțiile sulfitice reziduale este redată în fig. 84.

Cantitatea de lapte de var adăugată variază, în funcție de *p*H-ul inițial al soluției desulfitate, între 0,8 și 1,4 kg CaO/m³ soluție desulfitată. Această cantitate se determină astfel încît, după tratarea cu lapte de var, soluția reziduală să aibă totdeauna un *p*H cît mai constant, neadmițîndu-se variații mai mari de ±0,1 unități *p*H. După tratarea cu lapte de var urmează adăugarea soluției de amoniac 25%, pînă cînd se ajunge la *p*H-ul final dorit. Cantitatea de amoniac se adaugă în condițiile arătate la neutralizarea numai cu amoniac și este totdeauna constantă, deoarece *p*H-ul soluțiilor reziduale după tratarea cu lapte de var devine constant, așa după cum s-a arătat. Acest fapt are o deosebită importanță, deoarece soluția finală rămîne cu un

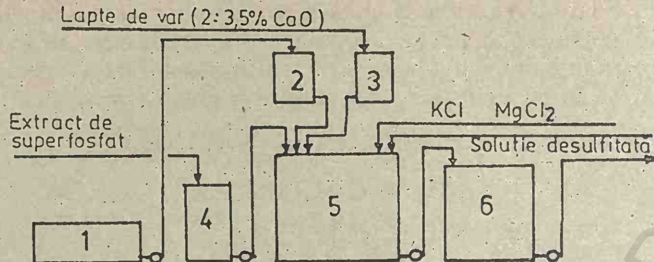


Fig. 84. Schema instalaţiei de neutralizare combinată a soluţiilor sulfitice reziduale desulfitate:

1 — rezervor de amoniac; *2* — rezervor pentru dozarea amoniacului; *3* — rezervor pentru dozarea laptelui de var; *4* — rezervor colector pentru extractul de superfosfat; *5* — rezervor de neutralizare; *6* — rezervor de soluţie neutralizată decantată.

conţinut de azot constant, ceea ce permite o conducere uşoară a procesului de fermentare, prin evitarea dereglărilor provocate de concentraţia variabilă în azot a soluţiilor reziduale neutralizate.

Comparativ cu celelalte două metode, metoda de neutralizare combinată are un număr mare de avantaje, printre care:

— reducerea consumului de amoniac, prin ridicarea *p*H-ului la o valoare constantă cu lapte de var;

— obţinerea unei soluţii reziduale cu un conţinut de azot şi *p*H constante;

— eliminarea excesului de amoniac, care se produce în cazul neutralizării prin metoda numai cu amoniac;

— permiterea introducerii unei cantităţi de amoniac de numai 70%, faţă de întreaga cantitate de amoniac necesară dezvoltării şi înmulţirii drojdiilor, diferenţa de 30% introducîndu-se în timpul fermentării, ceea ce permite reglarea *p*H-ului la fermentatoare.

Un factor deosebit de important care influenţează mult procesul de neutralizare a soluţiilor reziduale, indiferent de modul cum se realizează acesta, îl constituie metoda de agitare utilizată care poate fi făcută, aşa cum s-a arătat, sau mecanic, folosindu-se agitatoare obişnuite cu palete, sau prin barbotare cu aer. Dintre aceste două metode, barbotarea cu aer este mai avantajoasă, în cazul în care soluţiile reziduale mai conţin cantităţi apreciabile de dioxid de sulf, deoarece se permite eliminarea unei cantităţi mari de gaze şi substanţe volatile din soluţiile reziduale desulfitate, mărind astfel gradul lor de desulfitare.

S-a constatat că la o temperatură mai mare de 70°C (temperatura soluţiei reziduale desulfitate) barbotarea intensă cu aer face să se elimine circa 30% din cantitatea totală de SO_2 aflată în soluţia reziduală desulfitată, ceea ce prezintă un deosebit interes, deoarece cu cît conţinutul în SO_2 este mai mic, cu atît soluţiile reziduale devin mai apte pentru dezvoltarea şi înmulţirea drojdiilor. În plus, eliminarea avansată a dioxidului de sulf face să scadă aciditatea mediului, iar consumul de materiale folosite la neutralizare să se reducă corespunzăror.

Problema neutralizării prehidrolizatului din lemn de foioase este o problemă deosebit de grea, avînd în vedere conţinutul deosebit de ridicat de substanţe coloidale de natură ligninică. În cazul neutralizării cu lapte de var,

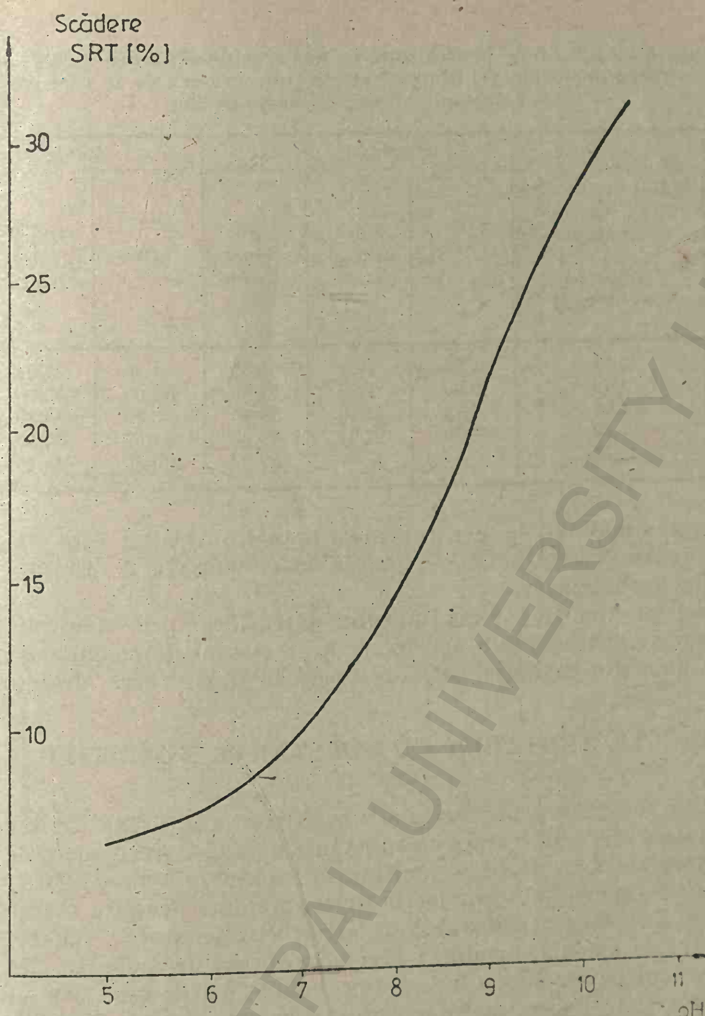


Fig. 85. Variația conținutului de substanțe reducătoare totale (SRT) prin neutralizare cu laptele de var în cazul prehidrolizatului din lemn de fag.

apar o serie de inconveniente majore care constau în apariția unor depuneri dure ce influențează neutralizoarele, imposibilitatea menținerii unui pH constant, precum și pierderi importante de zaharuri (Herczgh, 1987).

În fig. 85 se prezintă scăderea conținutului de substanțe reducătoare totale prin neutralizare cu lapte de var, constatîndu-se că aceste pierderi pot atinge 15% la un $p\text{H} = 7{,}8-8{,}2$.

Inconvenientele realizate prin neutralizare cu lapte de var (mai ales problema depunerilor) pot fi înlăturate prin neutralizare cu amoniac. În tabelul 45 se prezintă influența procesului de neutralizare cu apă amoniacală asupra conținutului de furfurol și zaharuri, din predihrolizatul provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag, remarcîndu-se scăderea concentrației în special în furfurol (peste 50%) și în zaharuri (Stanciu, 1984).

Influența procesului de neutralizare cu apă amoniacală asupra conținutului de furfurol și zaharuri din prehidrolizatul provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag

pH inițial	Număr ml soluție amoniac 25% pentru neutralizarea la pH = 5 a 1 000 ml prehidrolizat	Furfurol, g/l			Zaharuri, g/l		
		Inițial	După neutralizare	Scade conținutul de furfurol	Inițial	După neutralizare	Scade conținutul de zahăr
3,5	1,56	2,99	1,03	65,55	34,34	27,54	19,80
4,1	1,70	2,99	1,26	57,85	32,00	30,00	6,25
3,3	1,50	5,52	2,53	54,16	43,40	38,30	11,75
3,1	1,30	7,60	2,64	65,26	34,34	30,50	11,18
3,8	2,00	4,37	2,07	52,63	38,80	33,40	13,91

Aerarea simultană la neutralizarea prehidrolizatului este de asemenea indicată, deoarece determină eliminarea mai avansată a substanțelor inhibitoare din prehidrolizat.

Paralel cu diminuarea conținutului de furfurol prin neutralizare și suflare cu aer se constată și o accelerare a procesului de coagulare a substanțelor coloidale din prehidrolizat, care jenează dezvoltarea drojdiilor.

3.5.8. TRATAREA CU SUBSTANȚE NUTRITIVE

Soluțiile reziduale neutralizate și omogenizate sînt pregătite în continuare pentru fermentare, prin tratare cu substanțe nutritive, furnizoare de elemente chimice necesare dezvoltării și multiplicării normale a drojdiilor.

Pentru formarea substanțelor proteice, drojdiile necesită o sursă de azot asimilabilă. Drojdiile asimilează bine sărurile amoniacale : sulfatul de amoniu, fosfatul de amoniu, amofosul și soluția apoasă de amoniac. Nu se poate utiliza azotitul de amoniu, care se descompune foarte ușor, iar anionul acidului azotos (NO_2^-) este un toxic puternic pentru drojdii (fig. 86).

Fosforul este un alt element care joacă un rol decisiv în reacțiile biochimice ale metabolismului intermediar. În cazul lipsei de fosfor la drojdii se observă un conținut redus de proteine și concomitent un regres al consumului de zaharuri și al formării biomasei (fig. 87).

M a a s-F o r s t e r (1955) au constatat că între consumul de fosfor și conținutul de proteine intervine o relație strînsă și că preluarea de azot are loc doar foarte încet, dacă s-a consumat fosforul din mediul nutritiv.

Există un raport optim (3,0—4,0) între cantitatea de azot și fosfor la care se realizează un randament maxim în biomasă și un conținut ridicat de proteine.

S-a demonstrat că potasiul și magneziul au un rol deosebit în metabolismul drojdiilor, prezența lor în mediul de multiplicare în concentrații optime asigurînd o înmulțire rapidă și un randament ridicat.

Potasiul accelerează absorbția fosfaților care se sistează în absența sa (Schmidt, 1949). Potasiul ca și amoniul, care-l poate substitui într-o oarecare măsură, participă la formarea metalo-fosfaților pentru stocarea de energie

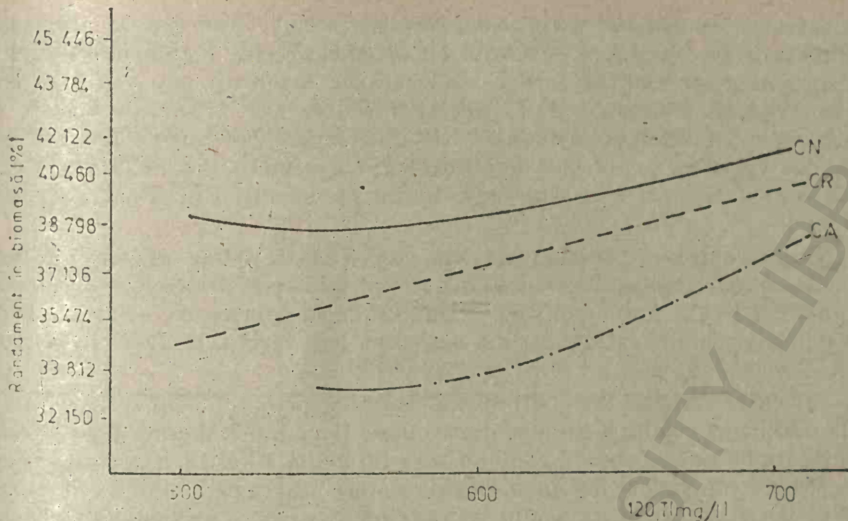


Fig. 86. Variația randamentului în biomasă, funcție de variația conținutului de azot.

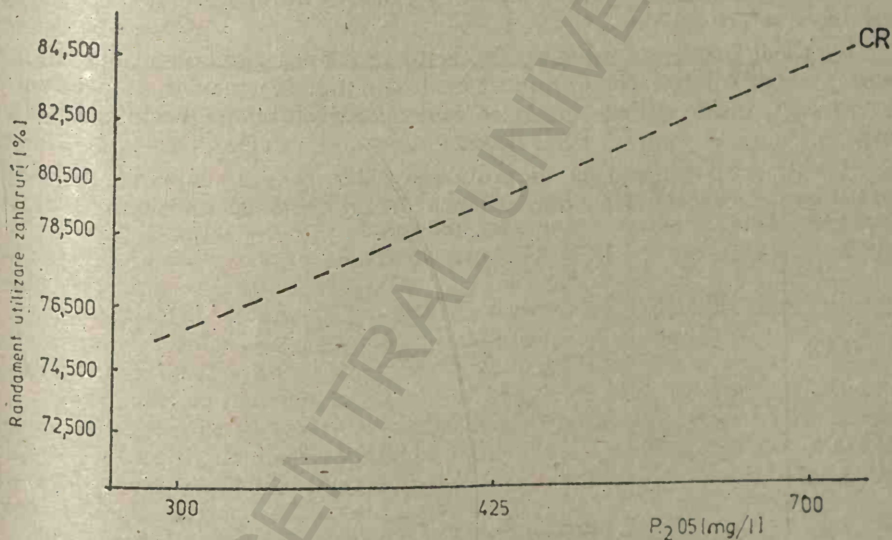


Fig. 87. Variația randamentului de utilizare a zaharurilor, funcție de conținutul de fosfor

în compușii macroergici, fiind astfel în strînsă relație cu funcțiile celulare ce furnizează și transmit energie. De asemenea, acest element are o acțiune reglatoare a *p*H-ului din interiorul celulei prin fixarea de ioni H^+ la metaboliții fosforilizanți ai metabolismului și la suprafața enzimelor ; celula poate constant să schimbe ionii H^+ formați în metabolism cu ionii K^+ și să facă suportabile concentrația de ioni H^+ în interiorul celulei.

Importanța fiziologică a magneziului constă în primul rînd în rolul său de activator al compușilor de fosfor. S-a constatat că cel mai bun randament în drojdii se obține cînd concentrația în K_2O raportată la substanțele

reducătoare este de 1,1% și cînd concentrația în MgO raportată la substanțele reducătoare este de 0,1%. Potasiul se asimilează sub formă de clorură de potasiu, iar magneziul sub formă de clorură de magneziu sau sulfat de magneziu. Potasiul și magneziul nu pot fi introduse sub formă de azotiți, din cauza acțiuni inhibitoare a ionului NO_2^-. În general, ordinea adăugării substanțelor nutritive în soluțiile neutralizate este următoarea : RNH_4 (în cazul în care neutralizarea s-a făcut cu hidroxid de calciu), PK, R_2Mg, săruri de fosfor.

Studii complexe utilizînd metoda corelației statistice privind influența sărurilor nutritive asupra procesului de multiplicare a drojdiilor furajere utilizînd ca substrat leșiile sulfitice reziduale de la fabricarea celulozei pergaminabile și prehidrolizatul din lemn de fag au fost efectuate de Stanciu (1984) și Ciobanu (1975).

În cazul multiplicării drojdiilor furajere pe prehidrolizatul provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag adaptînd ca criteriu de comparație raportul de corelație, se constată influența diferită a sărurilor nutritive asupra randamentului în biomasă, asupra randamentului de utilizare a zaharurilor și asupra conținutului în proteine. În ceea ce privește randamentul în biomasă la culturile pure *(Candida arborcea* și *Candida robusta)*, o influență hotărîtoare o are conținutul de azot (fig. 88), urmat de conținutul de pentoxid de fosfor, pe cînd la cultura mixtă se remarcă influența deosebită a magneziului și a fosforului.

La *Candida robusta* influența hotărîtoare asupra randamentului de utilizare a zaharurilor o are conținutul de fosfor (fig. 87), urmat de conținutul de azot, pe cînd la cultura mixtă se remarcă influența magneziului și fosforului.

Sub aspectul conținutului de proteine rezultă, la toate culturile, influența hotărîtoare a azotului (fig. 88), urmată de influența magneziului.

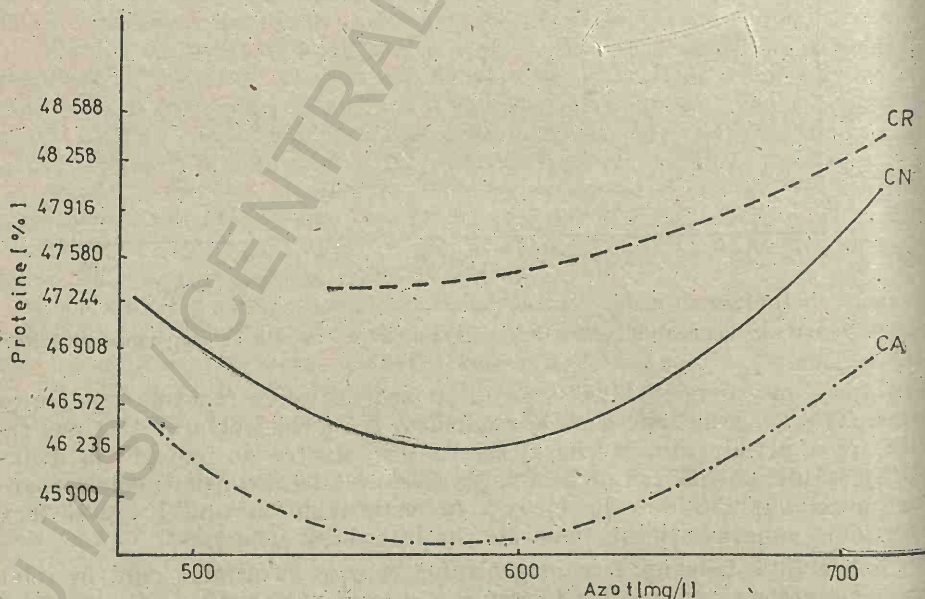


Fig. 88. Variația conținutului de proteine cu variația conținutului de azot.

Pe baza acestor date se poate afirma că există o anumită specificitate față de sărurile nutritive, funcție de specia de drojdie sau de felul culturii, pură sau mixtă.

Tabelul 46 prezintă consumurile specifice de săruri nutritive pentru fabricarea drojdiilor furajere care utilizează ca substrat leșiile sulfitice reziduale și prehidrolizatul din lemn de foioase și rășinoase.

Tabelul 46

Consumuri specifice de săruri nutritive la fabricarea drojdiilor furajere (kg/t)

Săruri nutritive	Leșii sulfitice		Procedeul Pekilo	Prehidrolizat	
	Bază calciu	Bază amoniu		Foioase	Rășinoase
Apă amoniacală (concentrație 25%)	423	580	110	480	940
Superfosfat (17% P_2O_5)	164	—	—	—	140
Fosfatdiamoniu (46% P_2O_5)	—	—	—	300	—
Îngrășămînt complex	—	71	55	—	—
Acid fosforic	—	—	28	60	—
Clorură de potasiu (60% K_2O)	33	45	—	—	50
Dolomită (13–14% MgO)	—	—	—	—	—
Clorură de magneziu	3,7	—	—	—	—

Pentru dezvoltarea drojdiilor este necesară și prezența microelementelor, precum și a unor factori de creștere, între care vitaminele, anumiți aminoacizi etc.

Prezența oligoelementelor este esențială în dezvoltarea microorganismelor, acestea influențînd randamentul, viteza de creștere și densitatea masei celulare, acționînd asupra sistemelor enzimatice ale celulei (Staniciu, Baiulescu, Herczgh, Maxim, 1991).

S-a constatat că activitatea unor enzime se intensifică în prezența unor ioni metalici. Dintre aceștia amintim mai ales ionii Fe^{2+} și Fe^{3+}, Cu^{+} și Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} și Mn^{4+}, Zn^{2+}, Mo^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} și K^{+}.

Dintre elementele cunoscute fierul are o deosebită importanță. Fierul este un catalizator al reacțiilor de oxidare și stimulator al dezvoltării drojdiilor. Conținutul de fier din drojdii este de 0,1–0,16%, față de substanța absolut uscată, putînd ajunge la 0,3–0,48% la drojdiile înnobilate cu fier (Soloviov, Riabcink, 1989).

La genul *Rhodotorula*, carența de fier împiedică formarea carotenoizilor. După cum fierul este legat de sinteza factorilor de creștere, cuprul este esențial pentru formarea citocromilor și este implicat în unele sisteme oxidative.

Un rol important în procesele biochimice îl joacă și zincul. Acesta favorizează transformarea produșilor de scindare a hidraților de carbon în părțile componente ale celulei, reduce conținutul de fosfor anorganic și crește conținutul fracțiilor organice — fosfolipide și ADN. O influență esențială asupra dezvoltării drojdiilor o are, de asemenea, manganul și molibdenul. Manganul nu intră în componența fermenților dar le generează activarea, participă la procesele de schimb de azot și la respirație.

Este posibil ca și alte elemente prezente ca urme să aibă un rol dar ca această acțiune a lor să fie ascunsă prin urmele din aceste elemente ce pot exista ca impurități în alte substanțe nutritive.

3.6. TEHNOLOGIA DE FABRICARE A DROJDIEI UTILIZÎND CA SUBSTRAT SOLUȚIILE SULFITICE REZIDUALE ȘI PREHIDROLIZATELE DE LA FABRICAREA CELULOZELOR

3.6.1. MICROORGANISME UTILIZATE ÎN FABRICAȚIA DROJDIILOR FURAJERE

Multiplicarea industrială a drojdiilor furajere este condiționată de o serie de factori fizico-chimici și biologici.

Dintre factorii biologici remarcăm, în principal, natura microorganismelor utilizate în procesul de multiplicare.

Microorganismele utilizate în procesul de multiplicare industrială a drojdiilor trebuie să îndeplinească o serie de condiții cum ar fi :

— durata de generare cît mai scurtă ;
— randament de fabricație și conținut de proteine ridicat ;
— să aibă o mare vitalitate, mai ales în cazul multiplicării continue ;
— să fie puțin sensibile la infecții, inhibitori și la variațiile calitative ale mediului.

De obicei, tipurile de drojdii se aleg în funcție de natura mediilor de cultură.

Dată fiind marea variabilitate și adaptabilitate a drojdiilor la diversele condiții de mediu, se pot cultiva cu rezultate bune diferite rase, tulpini, specii și chiar genuri de drojdii sau ciuperci pe leșiile sulfitice reziduale și pe prehidrolizate.

În practica industrială se utilizează în mod frecvent următoarele genuri și tipuri de drojdii : genul *Candida*, tipul *Candida scottii*, *Candida robusta*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida melinii*, genul *Trichosporon*, tipul *Tr. cutaneum*, *Tr. pullulans* etc., genul *Torulopsis*, tipul *T. candida*, *T. holmii*, *T. famata*, *T. sphaerica* etc.

În linurile de fermentare se mai întîlnesc drojdiile din genul *Cryptococcus*, iar alte fabrici utilizează drojdiile *Hansenula*.

Analizînd multiplicarea drojdiilor furajere pe leșiile sulfitice reziduale, luînd drept criteriu de apreciere calitativă procentul de azot proteic, se constată un conținut maxim la *Candida robusta* (56,25%), furnizat de proporțiile însemnate de histidină și aspargina din compoziția aminoproteică (Rozmarin și colab., 1973).

Adăugînd la acest criteriu productivitățile cele mai importante realizate la această specie, a rezultat că pentru producția curentă se poate reține specia *Candida robusa*, care însă realizează un randament minim de utilizare a zaharurilor reducătoare (numai 54%), consumînd practic numai o jumătate din zaharurile existente în leșiile reziduale. Dacă se recurge la un alt criteriu de estimare calitativă, și anume randamentul de utilizare a substanțelor reducătoare, se constată valori maxime la specia *Candida arboreea* (94%), deși acest gen se plasează la un nivel mediu în privința conținutului de azot proteic.

Candida tropicalis realizează o productivitate mică, deși utilizează în proporție însemnată zaharurile din soluție (75—80%), pe care le consumă specific, sintetizînd cantități mari de acid glutamic și tirozină.

Pentru producția curentă, nu se recomandă ultimele două specii.

Folosind amestecuri de două, trei sau patru genuri multiplicate în comun în linuri, se desprinde posibilitatea modificării caracteristicilor producției marfă în funcție de indicele urmărit: productivitate convenabilă, compoziție specifică în aminoacizi și randament diferențiat de utilizare a zaharurilor din soluțiile sulfitice reziduale.

Amestecurile de *Candida arborea*, *Candida tropicalis* și *T. utilis*, multiplicate în comun, se plasează sub aspectul epuizării zaharurilor în zona valorilor satisfăcătoare (78%), reprezentînd în același timp o compoziție aminoproteică de bună calitate.

La fabricarea drojdiilor furajere se pot utiliza și amestecuri de microorganisme din diferite genuri: genul *Candida*, genul *Trichosporon*, genul *Torulopsis* etc.

Drojdia *Trichosporon cutaneum* are o viteză de creștere comparativ redusă cu celelalte tipuri de drojdii, însă asigură o asimilare mai profundă a substanțelor organice, în particular a acizilor organici.

Oportunitatea utilizării unei astfel de culturi asociative este legată de tipul pozitiv de interacțiune între drojdiile *Candida* și *Trichosporon*, interacțiune de tip stimulator (mutualism).

Actualmente există o preocupare deosebită pe linia utilizării unor noi tipuri de drojdii, mai productive și mai rezistente la inhibitori.

Pe această linie se înscriu și lucrările de aclimatizare a drojdiei *Candida scottii* pe prehidrolizatul provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag și pe leșiile sulfitice reziduale cu baza de amoniu și sodiu (Stanciu, Herczegh, Iacob, 1990, Herczegh, 1991).

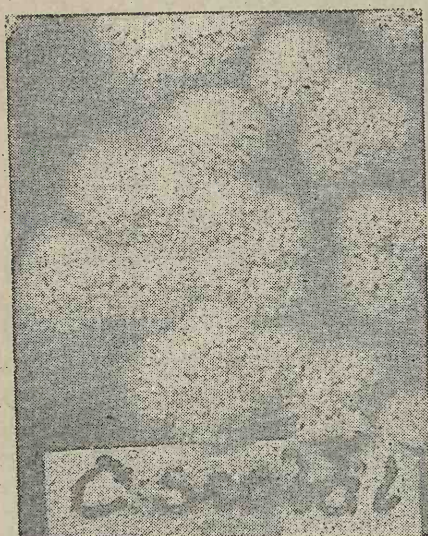
Drojdiile *Candida scottii* din punct de vedere morfologic se prezintă sub formă de celule oval elipsoidale dispuse sub formă de lanț, cîte 5—7—12 celule cu înmugurire din toate părțile (fig. 89).

Coloniile dezvoltate pe agar de bere sînt de culoare alb-crem, cu suprafața mărunt ridată, cu granulație fină. Profilul coloniei este bombat.

În fig. 90 sînt prezentate comparativ coloniile de drojdie *Candida scottii* cu diverse colonii de drojdii.



Fig. 89. Aspectul drojdiei *Candida scottii* multiplicate pe prehidrolizat provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag.





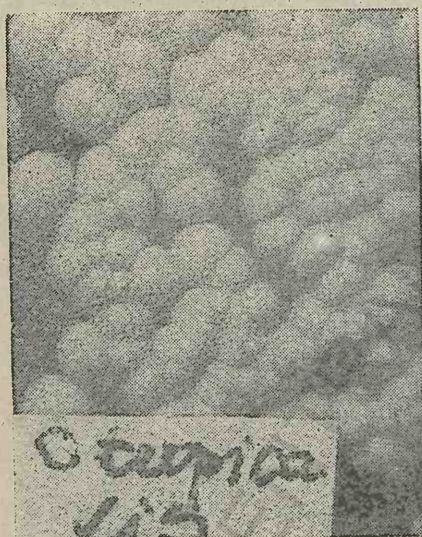


Fig. 90. Aspectul comparativ al diverselor colonii de drojdii:
a — *Candida scottii*; *b* — *Candida tropicalis*; *c* — *Candida utilis*; *d* — *Candida arboreea.*

Drojdiile *Candida scottii* asimilează bine atît hexozele cît și pentozele, precum și acizii organici și uronici.

Tabelul 47 prezintă performanțele drojdiei *Candida scottii* multiplicată pe prehidrolizat din lemn de fag și pe leșii sulfitice reziduale, comparativ cu diverse tipuri de drojdii și policulturi.

Datorită proprietăților sale (randament în biomasă și conținut în proteine ridicat), drojdia *Candida scottii* poate fi introdusă în fabricație industrială atît sub formă de cultură pură cît și sub formă de cultură mixtă, în combinație cu celelalte specii de drojdie *Candida* (în acest caz are o influență stimulatoare asupra dezvoltării celorlalte specii de drojdii, deoarece secretă vitamina H, biotina).

Tabelul 47

Performanțele drojdiei *Candida scottii* multiplicate pe prehidrolizat de lemn de fag și pe leșii sulfitice reziduale, comparativ cu diverse tipuri de drojdii

Parametrii în (%)	Prehidrolizat din lemn de fag				Soluție bisulfit de calciu	Soluție bisulfit de sodiu aerată, neutralizată cu lapte de var + amoniac			Soluție bisulfit de sodiu, desulfitată, neutralizată cu amoniac
	Candida scottii	*Candida arborea*	*Candida robusta*	*Candida arborea+robusta*	*Candida scottii*	*Candida scottii*	*Candida utilis + C. tropicalis + C. arborea*	*Candida scottii + C. utilis + C. tropicalis+C. Arborea*	*C. scotti + C. utilis + C. tropicalis + C. arboreea*
Randament în biomasă	64,40	35,85	37,84	39,39	46,40	44,60	43,00	47,30	40,00
Randament de consum al substanței reducătoare totale	85,64	78,30	78,31	76,74	81,00	72,00	68,00	75,00	62,00
Randament de consum al azotului	46,43	52,84	53,27	55,99	78,50	75,00	72,00	78,00	65,00
Randament de consum al P_2O_5	59,68	48,39	48,86	69,90	74,50	73,00	68,00	75,00	63,00
Conținut de proteine	53,51	47,22	48,00	47,37	52,20	50,00	45,00	52,00	43,00

Tabelul 48

Acțiunea unor dezinfectanți chimici asupra unor microorganisme

Dezinfectanți	Timpul necesar pentru distrugerea microorganismelor (în min)				
	Micodermă	Torula	Bacterii acetice	Lacto bacterii	Bacilul finului
NaOH (0,5%)	15	15	15	120	Nu acționează
NaOH (1%)	15	30	15	15	Nu acționează
Formol (0,5%)	15	30	15	240	1 440
Clorură de var (0,1–0,2%)	5	5	5	5	240

Pe lîngă drojdiile care intră în componența populațiilor industriale de microorganisme, în cazul infecțiilor se remarcă prezența bacteriilor, mucegaiurilor și mai rar a actinomicetelor.

Sursele cele mai posibile de acces a microorganismelor străine în mediul de cultură sînt reprezentate de aerul ce se introduce în cuvele de multiplicare, precum și în rezervoarele deschise.

Infectarea mediului se poate produce și de la apa brută ce se introduce pentru diluarea prehidrolizatului.

Dezinfecția sistematică este necesară și pentru faptul că, în condiții industriale, în locuri puțin accesibile din instalații și pe conducte se depun drojdii furajere, care putrezesc după un timp oarecare, degajînd substanțe nocive pentru dezvoltarea drojdiilor.

Dezinfecția se poate realiza pe cale chimică, termică și mecanică. De regulă în practică se face uz de toate aceste procedee. Ca substanțe dezinfectante se utilizează clorura de var, formolul, cloramina și hidroxidul de sodiu.

Acțiunea unor substanțe chimice asupra unor microorganisme se prezintă în abelul 48. În general, se recomandă ca dezinfecția să se facă cel puțin la 1–2 luni.

3.6.2. TEHNICA PREGĂTIRII CULTURII PURE DE DROJDIE

Inoculul reprezintă cultura pură de drojdie adusă în forma viabilă și care este utilizată la însămînțarea plămezilor din instalația de multiplicare.

Inoculul se realizează în mai multe etape.

Însămînțarea în eprubete. Un număr de 5 eprubete „stoc" din frigiderul de depozitare a micotecii sînt aduse lent la temperatura de 20...24°C (temperatura camerei);

— se pregătesc 5 eprubete cu mediu nutritiv solid (geloză înclinată);

— se termostatează eprubetele inoculate la 38°C timp de 24 ore;

— se face o analiză microscopică pentru verificarea drojdiei și, dacă aceasta este corespunzătoare, se poate trece la însămînțarea pe plăci Petri;

— se însămînțează 10 plăci Petri cu $d = 10$ cm, care se mențin în termostat la 38°C timp de 24–36 ore.

Cultivarea drojdiilor în baloane. Se pregătește un mediu nutritiv Andreev avînd următoarea compoziție:

— H_3PO_4 (1–10) — 1,9 ml;
— CH_3COOH (1–10) — 8,0 ml;
— KCl — 0,15 g
— $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ — 0,075 g;
— $Ca(HSO_4)_2$ — 0,0125 g (se poate înlocui cu $NH_4H_2PO_4$);
— NH_4OH (20%) — 1,0 ml;
— NaOH (0,1 N) — 2,0 ml;
— glucoză — 30,0 g;
— autolizat de drojdie — 5,0 ml;
— apă potabilă — 1 000 ml.

Se aduce la $pH = 6,0$ cu apă amoniacală și se sterilizează 20 min la 1 bar. Biomasa obținută pe plăcile Petri se adună cu ajutorul unei spatule sterile, iar cu cantitatea de drojdie recoltată de pe o singură placă, se însămînțează două buloane de 500 ml, conținînd cîte 50 ml mediu nutritiv Andreev. Cel două baloane se închid steril, cu dopuri de vată și se introduc în termostatul cu masa de agitare la 38°C. În lipsa unui termostat cu masă de agitare, baloanele se introduc într-un termostat obișnuit și se va avea grijă să se agite cît mai des în toată perioada de menținere în termostat.

După 15—16 ore în fiecare balon se mai introduc cîte 50 ml mediu Andreev. Durata totală de menținere în termostat este de 18—20 ore. Se efectuează controlul microscopic al purității drojdiei, iar după control fiecare balon se șterge cu alcool.

Transplantarea în aparatul de cultură pură (de laborator). Aparatul de cultură pură (de laborator) are un volum total de 10 l (volum util 5 l).

În fermentatorul de laborator, foarte bine sterilizat în prealabil, se introduc :

— mediul Rieder — 400 ml ;
— apă distilată — 2 100 ml.

Compoziția mediului Rieder este :

— glucoză — 30 g ;
— $(NH_4)_2SO_4$ — 3 g ;
— $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ — 0,7 g ;
— NaCl — 0,5 g ;
— $Ca(NO_3)_2$ — 0,4 g ;
+ KH_2PO_4 — 1,0 g ;
+ autolizat de drojdie — 10 ml ;
+ apă potabilă — 1 000 ml.

Concentrația în substanțe reducătoare în fermentator este de 0,3—0,35%, iar volumul plămezii este de 3 500 ml. După cîteva ore de dezvoltare a culturii la 35°C cu aerare intensă, cînd concentrația în substanțe reducătoare scade la valoarea de 0,1—0,14%, se completează volumul de soluție cu mediu Rieder pînă la 6 000 ml. Se controlează dezvoltarea drojdiei prin scăderea concentrației în substanțe reducătoare și creșterea cantității de biomasă.

După 8—10 ore, concentrația în biomasă este de 7—9 g drojdie s.u./l soluție. În acest moment, se scoate din fermentator cantitatea de 3 000 ml și se completează cu 3 000 ml mediu Rieder.

Se procedează astfel pînă cînd se colectează 8—10 l plămadă cu 7—10 g/l drojdie. Eventual, se poate păstra drojdia oținută prin filtrare pe o pîlnie Buchner.

Plămada din aparatul de laborator constituie marerialul de inocul pentru fermentatoarele semiindustriale (instalația de cultură pură).

Multiplicarea drojdiei pe instalația de cultură pură industrială. În fig. 91 se prezintă schema instalației de cultură pură cu care este dotată fiecare fabrică de drojdie furajateră.

Instalația de cultură pură este compusă din două recipiente de multiplicare confecționate din oțel inoxidabil (BAF și CUBO), prevăzute cu sisteme de aerare, încălzire, răcire interioară și exterioară.

Recipientul, avînd denumirea convențională de BAF, are un volum de 300—500 l, iar recipientul CUBO are un volum de 1 000—3 000 l.

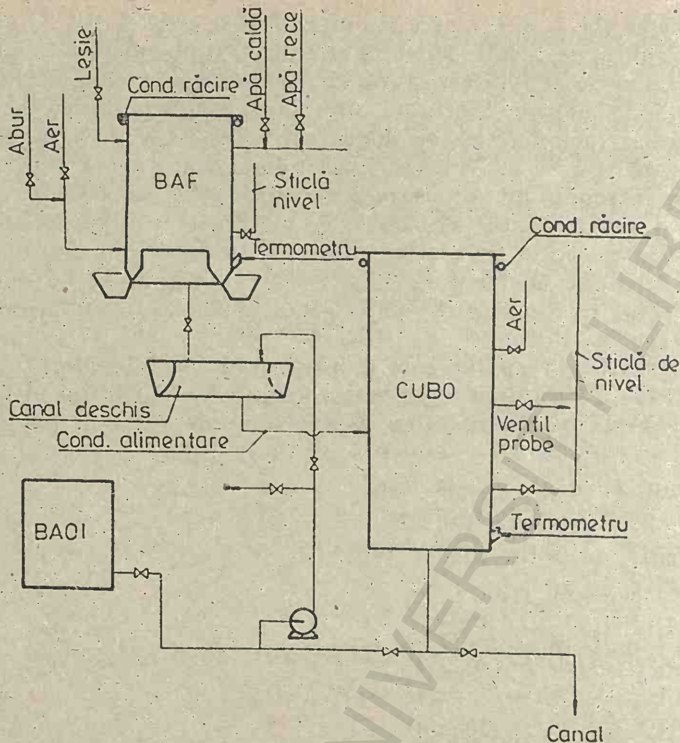


Fig. 91. Schema instalației de cultură pură industrială.

Transplantarea drojdiei în BAF. Înainte de trecerea mustului din aparatul de cultură pură din laborator, în BAF, acesta trebuie spălat foarte bine cu apă, apoi cu soluție de formol 4—5 ore la fierbere și apoi din nou cu apă. După spălare, se introduc 25 l mediu M nesterilizat, la $pH = 4{,}8$ și se încălzește la 60...80°C, după care se răcește la 38°C. Compoziția mediului M și 2 M este redată mai jos:

Varianta I	Mediu M	Mediu 2 M
melasă	40 g	80 g
$(NH_4)_2HPO_4$	2 g	4 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g	2 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5 g	1 g
apă	1 000 ml	1 000 ml

În rezervor se introduce și cantitatea de biomasă obținută în aparatul de cultură pură de laborator.

Din 30 în 30 min se fac verificări de *p*H, concentrație în biomasă și analiza microscopică. Cînd concentrația în zaharuri scade sub 2 g/l, se mai introduc 25 l mediu 2 M și se aduce la *p*H-ul 4,5—4,8·*p*H-ul scade în timpul multiplicării, deoarece melasa se consumă integral. Cînd *p*H-ul ajunge la 3—4, iar concentrația în biomasă la 2—3 g/l, se mai introduc 50 l mediu 2 M și se ajustează *p*H-ul cu apă amoniacală.

La o nouă scădere a *p*H-ului, se mai introduc 100 l mediu 2 M și se ajustează *p*H-ul. Ultima parte din mediul 2 M se adaugă atunci cînd după ce

s-au mai introdus 100 l mediu, concentrația în drojdie se dublează. Acest ultim mediu este format din 200 l apă, 16 kg melasă, 1 kg NH_4Cl și 0,4 kg H_3PO_4. După adăugarea acestui mediu, concentrația în drojdie scade la jumătate, după care apoi începe să crească foarte repede.

Cînd concentrația în drojdie ajunge din nou la valoarea inițială, plămada se trece în rezervorul de aclimatizare CUBO, în care se găsește soluția ce conține substratul nutritiv (soluția sulfitică reziduală, prehidrolizatele).

Transplantarea drojdiei în CUBO. În rezervorul CUBO, foarte bine dezinfectat, se pregătește un mediu format din 500 l apă potabilă, 40 kg melasă, 1 kg H_3PO_4 și 2,5 kg NH_4Cl, ajustînd *p*H-ul la 4,5.

Se golește apoi conținutul rezervorului BAF în rezervorul CUBO, lăsînd 50 l rezervă în BAF. Apoi în CUBO se introduc 500 l soluție sulfitică reziduală sau prehidrolizat, 40 kg melasă, 2,5 kg NH_4Cl, 1 kg H_3PO_4, ajustînd *p*H-ul la 4,5.

Cînd concentrația drojdiei în CUBO ajunge la 5—8 g/l, se mai introduc 1 000 l soluție sulfitică reziduală sau prehidrolizat, 80 kg melasă, 2 kg H_3PO_4 și 5 kg NH_4Cl și se ajustează *p*H-ul.

Cînd concentrația în drojdie ajunge din nou la 5—8 g/l, se introduc din nou 1 000 l soluție cu 80 kg melasă, 5 kg NH_4Cl, 2 kg H_3PO_4 și se ajustează din nou *p*H-ul. Cînd din nou se ajunge la concentrația inițială a drojdiei, se golește CUBO în linul de fermentare, lăsînd 500 l mediu în CUBO pentru rezervă.

3.6.3. MULTIPLICAREA INDUSTRIALĂ A DROJDIILOR FURAJERE

3.6.3.1. DEGRADAREA AEROBĂ A HIDRAȚILOR DE CARBON ȘI BIOSINTEZA AMINOACIZILOR ȘI PROTEINELOR

Procesul de multiplicare a drojdiilor implică o serie de transformări biochimice complexe. Astfel, substanțele furnizoare de carbon asimilabil împreună cu celelalte substanțe nutritive sînt transformate în alte substanțe cu compoziție chimică mai complexă, din care cea mai mare parte o formează proteinele ce intră în structura celulelor de drojdie.

În fig. 92 sînt prezentate principalele faze de transformare fermentativă a D-xilozei (*1*), cu formarea acidului pirotartric (*13*), ca produs intermediar principal. Ca rezultat al izomerizării D-xilozei (*1*), se formează D-xiluloza (*2*), care se fosforilează trecînd în D-xiluloză-o-fosfat (*3*). Purtătorul grupelor de acid fosforic este adenozindifosfatul A D F. Prin ruperea legăturii $C_2—C_3$ din compusul (*3*) se formează acetatfosfat (*4*) și acid pirotartric (*13*). Ca produse intermediare se formează aldehida 3 fosfoglicerică (*5*), acidul 3 fosfogliceric (*6*), acidul fosfofenolpirotartric (*9*) și alți compuși care nu sînt evidențiați în schemă (Holkin, 1989). La formarea acetatfosfatului participă acidul fosforic sau sărurile acestuia.

Ciclul Krebs începe cu formarea acidului citric (*18*), prin condensarea acetil-cofermentului A-16 cu oxalatul acidului acetic (*30*), cu participarea fermentului citrat-sintetazei. Acidul citric (*18*) se deshidratează formînd acidul cis-aconitic (*19*), sub acțiunea aconilathidratazei. Același ferment acționează asupra formării acidului izocitric (*20*), ca rezultat al hidratării.

Decarboxilarea oxidativă a acidului izocitric (*20*), catalizată de izocitrat-dehidrogenază, duce la formarea acidului alfa-cetoglutamic (*22*) cu obținerea acidului tartro-succinic (*21*) ca produs intermediar.

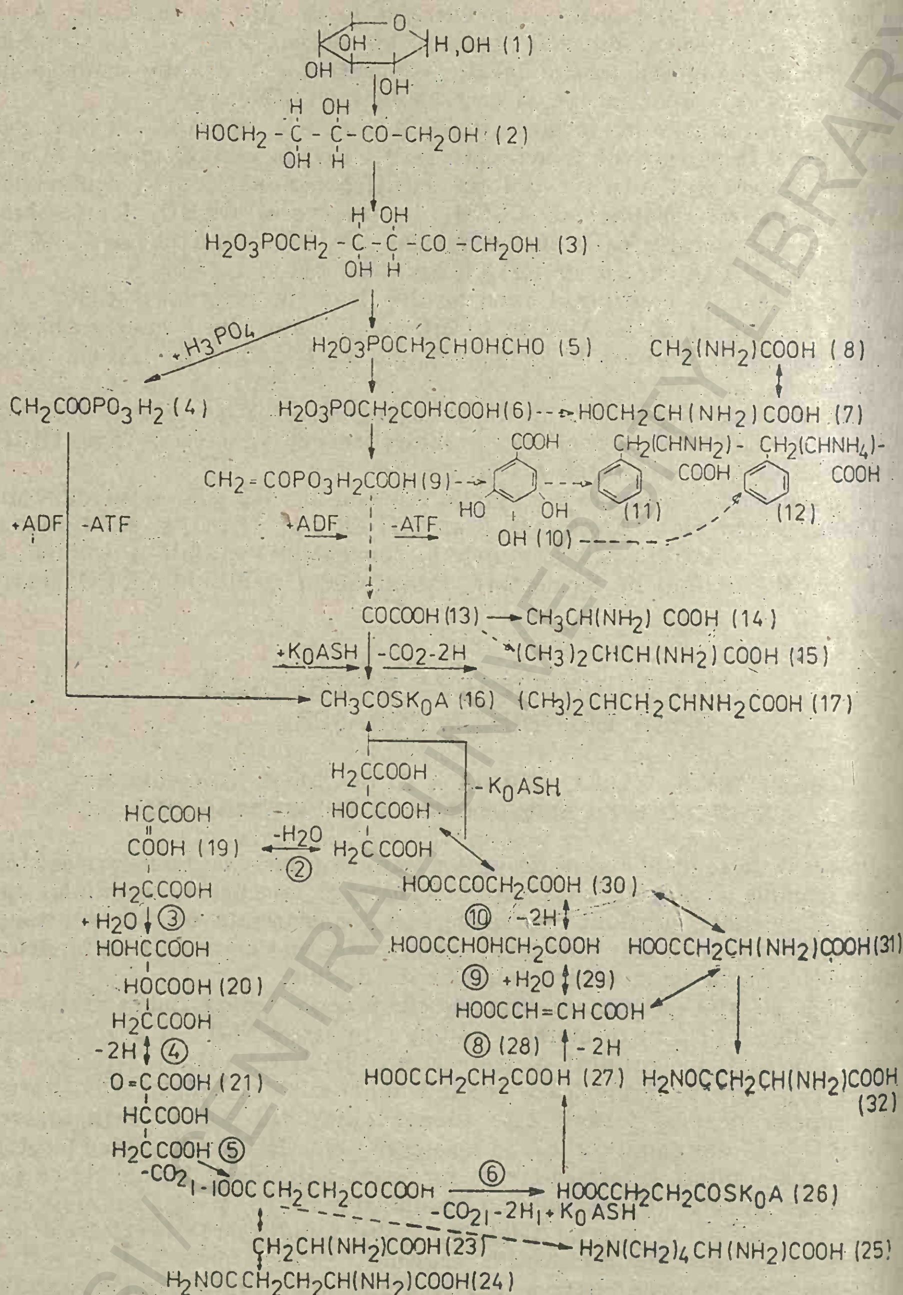


Fig. 92. Degradarea aerobă a D-xilozei și biosinteza aminoacizilor și proteinelor.

Prin deshidratarea și decarboxilarea acidului alfa-cetoglutamic (*22*) se formează cofermentul A-26, cu participarea fermentului alfa-cetoglutamic al dehidrogenazei. Formarea acidului succinic (*27*), are loc sub acțiunea succin-acetilchinazei. Aceasta se deshidratează sub acțiunea succinat-dehidrogenazei, cu formarea acidului fumaric (*28*) care trece în acidul L-malic, sub

acțiunea fumarat-hidratazei. Acidul L-malic sub acțiunea malat-hidrogenazei formează produsul finit al ciclului Krebs, oxalatul acidului acetic (*30*).

Atomii de hidrogen desprinși din combinațiile (*20*, *22*, *27* și *29*) formează apă prin intermediul unor protoni, ce intră în ciclul purtător, care intră în ciclul respirator.

Procesul de respirație aerobă are loc cu eliberarea unei cantități însemnate de energie 2,8—3,0·10³ kJ/mol glucoză. O parte din această energie este preluată de mediul de cultură, iar o parte este acumulată și consumată de microorganisme în reacțiile chimice de sinteza la nivel celular.

În procesul de biosinteză a proteinei din hidrații de carbon un rol important îl au acidul glutaminic și asparaginic. Din schema prezentată se vede că acidul glutamic (*23*) se formează ca rezultat al aminării acidului alfa-cetoglutamic (*22*). De asemenea, se sintetizează glutamina (*24*). Intermediarii acidului asparaginic (*31*) și asparaginei (*32*) sînt acizii fumaric (*28*) și oxalatacetic (*30*). Acidul alfa-acetoglutamic este de asemenea un produs intermediar al lizinei (*25*).

În schemă se ilustrează biosinteza acizilor monoamino-carboxilici-serina (*7*), glicina (*8*), alanina (*14*), valina (*15*), leucina (*17*). Aminoacizii ciclici tirozina (*11*) și fenilalanina (*12*) se formează prin intermediul acidului (*10*) din acidul fosfofenil-pirotartric.

Sinteza aminoacizilor cu utilizarea purtătorilor de azotat decurge prin eliberarea ionilor de hidrogen, ceea ce duce la acidularea mediului de cultură în procesul de fermentare.

Procesele de biosinteză a aminoacizilor și proteinei decurg în trepte, sub acțiunea fermenților specifici.

3.6.3.2. CUVELE DE MULTIPLICARE

O importanță deosebită pentru metabolismul drojdiei revine aerării corecte. Aceasta influențează direct randamentul, atît prin intervenția în sinteza masei celulare, cît și prin agitarea mediului și antrenarea subprodușelor volatile. Cu cît dispersia este mai fină și concentrația de oxigen din plămadă mai mare, cu atît crește eficiența procesului. Există o corelație între consumul specific de oxigen și viteza de dezvoltare a drojdiei redată prin relația (Mincinicopschi, Kathrein, Teodoru, 1987):

$$p = BP_m \frac{T_1}{K_0 + T_1} = KB\mu \qquad (218)$$

în care: p este consumul specific de oxigen; P_m — consumul specific maxim de oxigen; B — cantitatea de drojdie din sistem; μ — viteza de dezvoltare a drojdiei; T_1 — tensiunea de oxigen în sistem; K_0 — constanta lui Michaelis ($2{,}84 \cdot 10^{-1}$ M); K_1 — constantă.

Cu cît bulele de aer sînt mai mici, respectiv suprafața de contact cu plămadă este mai mare, cu atît scade consumul specific de oxigen. Durata de contact influențează de asemenea eficiența aerării.

De funcționarea corectă a aerării depinde în principiu toată reușita procesului de multiplicare, pornind bineînțeles de la premisa că se lucrează cu o cultură adecvată și cu un mediu nutritiv ales corect.

Sistemul de multiplicare industrială a drojdiilor este foarte diferit, în funcție de forma, volumul și sistemele de aerare a linurilor.

Numeroși autori au prezentat descrierea diferitelor cuve de multiplicare a drojdiilor (Kretzschmar, 1964, Andreev, Brînzgalov, 1969, Rozmarin, 1975, Holkin, 1989).

Tabelul 49 prezintă caracteristicile celor mai cunoscute sisteme industriale de multiplicare.

Tabelul 49

Caracteristicile celor mai cunoscute sisteme industriale de multiplicare
(Iagusch, Schönherr, 1972)

Sistemul de aerare	kg drojdie a.u./m³·h	Consum specific de energie electrică kWh/kg drojdie a.u.
Vogelbusch	3—4	0,45—1,0
Lefrancois	2—3	0,45—1,0
Waldorf	1—1,8	0,80—2,3
Pompe Mamut	2—3	1,00—2,0
Jet scufundat	7—8	0,35—0,5

Cuva de multiplicare sistem Vogelbusch. În fig. 93, se prezintă construcția unui lin, sistem Vogelbusch cu volumul de 250 m³. Aerul se introduce prin axul central și apoi prin paletele elicoidale, perforate, situate la fundul vasului (densitatea găurilor 10 000 găuri/1 000 cm², suprafața cu diametrul de 2—5 mm cu creșterea densității de la centru spre periferie). Presiunea de lucru a

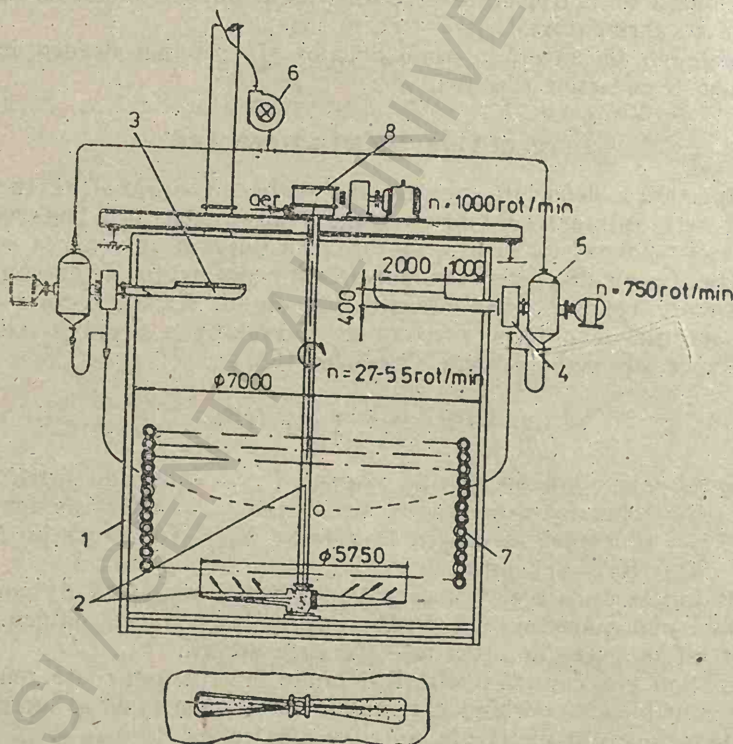


Fig. 93. Construcția cuvei de multiplicare sistem Vogelbusch:
1 — corpul aparatului; *2* — distribuitor de aer, Vogelbusch; *3* — căuș pentru colectarea spumei; *4* — dezintegrator; *5* — separator de gaze; *6* — exhaustor pentru bioxid de carbon; *7* — serpentină de răcire; *8* — reducător.

aerului este de 6 000 mm coloană apă. Viteza axului este de 27—55 rot./min, iar puterea motorului este de 20 kW. Înălţimea lichidului în aparat este de 2,0—2,2 m. Pentru spargerea spumei se foloseşte un sistem special de recirculare care constă în colectarea acesteia pe sub capacul linului şi atragerea ei prin intermediul unor dezintegratoare exhaustoare (*4*), într-un vas separator (*5*). Aerul separat cu un ventilator (*6*) este evacuat în atmosferă. Dezintegratorul reprezintă un tip de moară cu ciocane, acţionată de un motor de 30 kW (750 rot./min). Uneori dezintegratorul este înlocuit cu o cuşcă de veveriţă de 1 400 mm diametru şi înălţimea de 1 000 mm; ea se montează pe un ax exterior separat, rotindu-se în sens invers (70—100 rot./min) de la un motor cu o putere de 55 kW. Pentru o mai bună omogenizare, se montează suplimentar un rînd de palete între elicele barbotoare şi cuşca de veveriţă.

Cuva de multiplicare sistem Waldhof. Este prevăzută cu un ax gol de trimitere a aerului, refulat de o roată cu braţele curbate (roată Segner), o stea tubulară curbată ce se roteşte cu 320 rot./min, acţionată de un motor de 125 kW (fig. 94). Aerul este împins prin aceste tuburi curbate cu diametrul de 70 mm şi dispersat. Pentru asigurarea circulaţiei în cuvă se fixează la 600 mm înălţime un cilindru director (3), care asigură fluxul pe jos, dinspre interior pe sus. Colectarea se face pe jos printr-un ştuţ lateral. Răcirea este asigurată de o serpentină (*4*). Nivelul lichidului în cuvă este de 1,7—1,8 m,

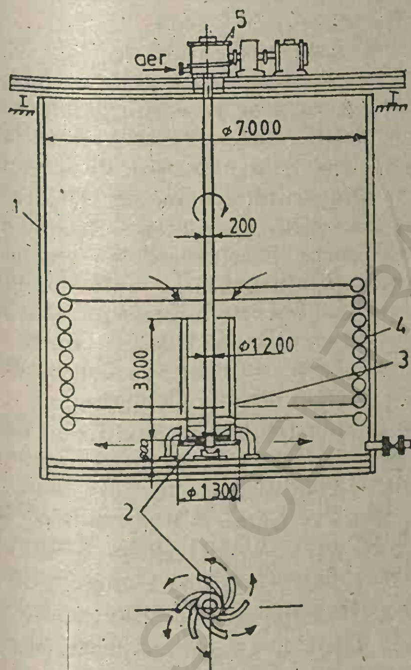


Fig. 94. Construcţia cuvei de multiplicare sistem Waldhof:

1 — corpul aparatului; *2* — tuburi distribuitoare pentru aer; *3* — cilindru director; *4* — serpentină; *5* — reductor.

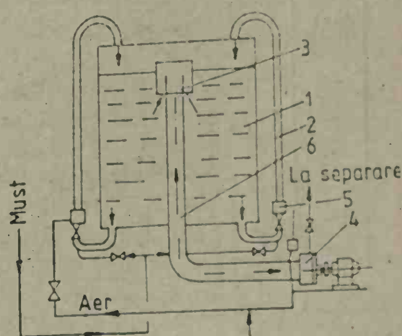


Fig. 95. Construcţia cuvei de multiplicare Scholler-Seidel:

1 — corpul aparatului; *2* — ţevi de recirculare; *3* — colector de spumă; *4* — spărgător de spumă; *5* — luminare Seidel; *6* — conductă de evacuare.

ceea ce reprezintă un coeficient de umplere de 22—25%. Această cuvă este recomandată pentru funcționarea pe leșii sulfitice cu conținut mărit de zaharuri. Consumul de aer este de 6 m³/h, cînd se lucrează cu must de concentrație ridicată (3,7% SR).

Cuva de multiplicare Scholler-Sidel. Este redată în fig. 95. Circulația suspensiei de drojdie se realizează prin admiterea concomitentă a aerului, cu ajutorul a 12 țevi de recirculare (*2*) cu diametrul de 350 mm, fixate jurîmprejurul cuvei. Cuva are un volum de 200 m³ și un raport $D/H = 1,0-2,5$. În interior se găsește un capac colector de spumă (d) și un tub de evacuare a spumei prin spărgătorul de spumă (*4*). Suspensia este aspirată la fund de țevile de circulație și cu ajutorul unor duze de aer-lumînări Seidel (*5*) se trimite în sus, se îmbogățește în aer și se reîntoarce în cuvă. Tot în aceste țevi se trimite mustul proaspăt, care se amestecă intim cu suspensia de drojdie și aer. O parte din spumă colectată prin (*6*) se transformă prin spargere în suspensie lichidă de drojdie în centrifuga Klaus (*4*) și se trimite la separare.

Aerul este refulat la o presiune de 6 000 mm coloană apă. Țevile de recirculare pot fi deconectate separt fără a opri cuva. Nivelul lichidului este 30% din înălțimea aparatului. Răcirea se face liber prin suprafața exterioară sau prin stropire cu apă.

Productivitatea cuvei este de 18—22 m³ must/h (3—4 t/zi drojdie). Firma Attisholz (Elveția) posedă cuve de 250 m³ capacitate, care pot prelucra 1 000—1 200 m³ pe zi must (5 t/zi drojdie). Consumul de aer este de 5 000 m³/h, iar consumul de energie este de 150—160 kWh. Durata fermentării este relativ mică, reprezentînd 2,5 ore.

Cuva de multiplicare Lefrancois-Mariller. Este prezentată în fig. 96. Principiul de funcționare se bazează pe refularea aerului trimis de o suflantă, care formează cu lichidul o emulsie. Spargerea spumei se face sub greutatea proprie, datorită înălțimii însemnate a aparatului. Prin trecerea aerului în partea inferioară a cuvei se formează o masă dispersată care se ridică prin interiorul difuzorului central (*2*). O parte din aer pleacă prin spargerea bulelor pe sus, o altă parte se reîntoarce cu spuma prin exteriorul difuzorului, spuma reluînd circuitul prin interiorul difuzorului (2—3 rot./min). Se realizează astfel uniformizarea mediului nutritiv și contactul maxim al acestui mediu cu aerul.

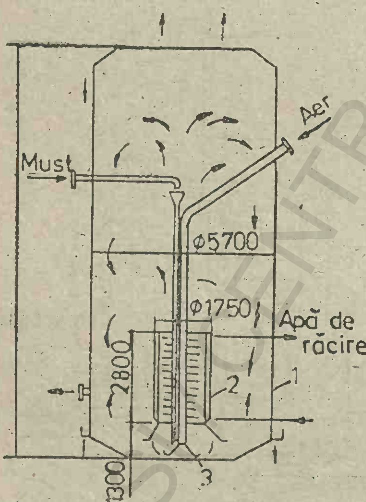


Fig. 96. Construcția cuvei de multiplicare Le francois Mariller:

1 — corpul aparatului; *2* — difuzorul director; *3* — cuva distribuitoare de aer.

Cuvele industriale au înălțimea de 12—15 m (înălțimea spumei este de 10—12 m). Lichidul staționar are o înălțime de 3,4—4,5 m. Presiunea suflantei este de 6 000 mm coloană apă. Răcirea se face prin pereții difuzorului și prin stropirea exterioară a pereților cuvei.

Productivitatea cuvei este de 4,0—4,5 t/zi drojdie. Necesarul de aer este de 18—20 m³/kg drojdie. Acest tip de cuvă este recomandat pentru prelucrarea leșiilor sulfitice reziduale diluate (1,5—1,8% substanță reducătoare).

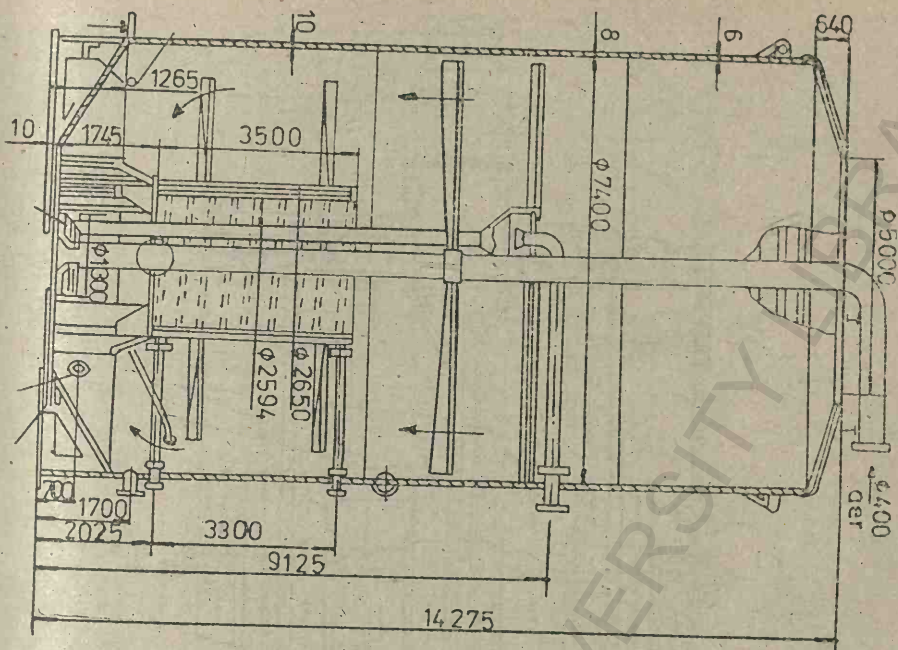


Fig. 97. Construcția cuvei de multiplicare tip aer-lift.

Cuva de multiplicare cu aer lift. Este prezentată în fig. 97.

Acest tip de cuvă ($V = 500$ m³) prezintă avantajul antrenării suspensiei le drojdie în curenți de circulație internă cu o bună omogenizare. Acest tip le cuvă nu are elemente mecanice de agitare și spargere a spumei. În scopul îmbunătățirii schimbului aer-lichid, deasupra difuzorului se fixează șicane le ghidaj a spumei care iese din difuzor. Aerul trimis de o suflantă intră ntr-o conductă centrală în sistemul distribuitor de la fundul aparatului (o antă inelară) cu o viteză de 20—25 m/s (presiunea la intrare este de 4,0—4,5 m oloană apă). Spargerea spumei se face pe seama greutății proprii.

Raportul D/H este de 1 : 2. Răcirea se face prin pereții difuzorului și prin pereții exteriori.

În scopul creșterii productivității și perfecționării tehnologiei de fabriare s-au adus în ultimul timp o serie de îmbunătățiri la cuvele de multilicare a drojdiilor. Perfecționarea cuvelor de multiplicare aer-lift vizează ntensificarea proceselor de schimb aer-lichid prin dotarea cu dispozitive nultizonale de distribuție a aerului.

Cuvă de multiplicare cu sistem multizonal de distribuție a aerului. Este prezentată în fig. 98. Aerul este introdus prin conducta *5* în aeratorul *10*, u o viteză de 20—25 m/s, unde intră și mustul de alimentare prin conducta *6*. mestecul aer-lichid cu densitatea mică (300—500 kg/m³) pătrunde în difuorul circular *7*, montat peste cuveta de distribuție a aerului. Datorită difeenței de densitate, amestecul se deplasează în sus. În partea de jos a difuorului pătrunde mediul mai dens, care se află între corpul cuvei și difuoare. În acest mod se realizează circulația permanentă a lichidului (efectul er-lift).

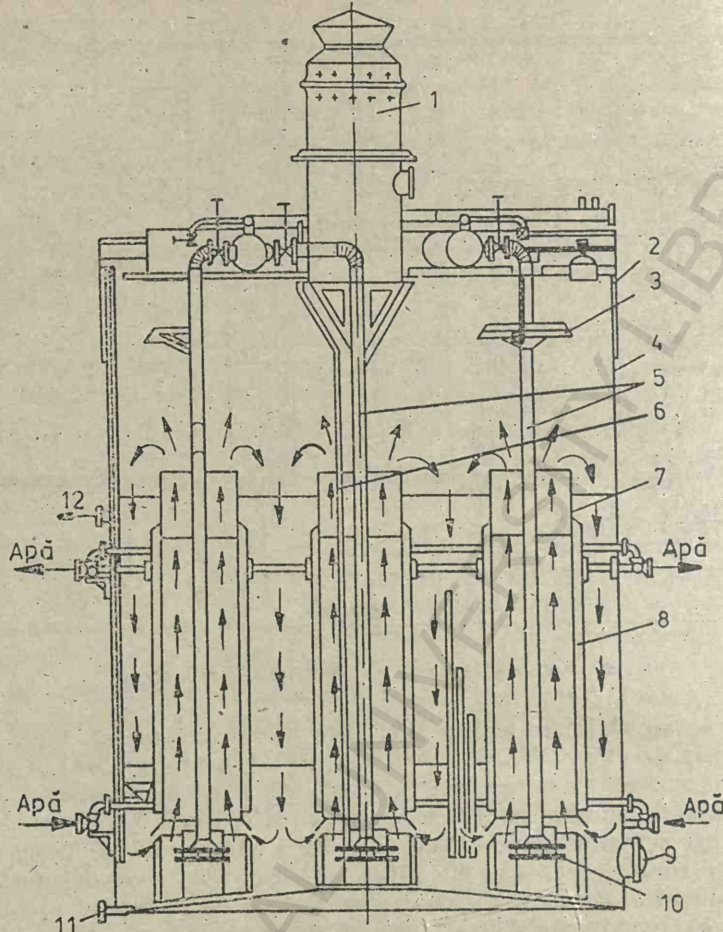


Fig. 98. Construcția cuvei de multiplicare cu sistem multizonal de distribuție a aerului:

1 — filtru pentru purificarea gazelor eliminate; *2* — dispozitiv de stropire cu apă; *3* — deflector; *4* — corpul aparatului; *5* — conducte; *6* — conducte pentru mediu nutritiv; *7* — difuzor; *8* — manta de răcire; *9* — manloc; *10* — aerator; *11* — ștuț de eliminare; *12* — ștuț de eliminare a suspensiei de drojdie.

Căldura excedentară degajată în timpul procesului de multiplicare este evacuată din cuvă prin intermediul apei de răcire care circulă prin mantaua celor opt difuzoare cît și prin stropirea exterioară a cuvei.

Cuvele cu un volum de 1 250 m³ au opt difuzoare.

În practică se folosesc aparate cu 1, 4, 5, 8, 9 difuzoare. O dată cu creșterea numărului de difuzoare pînă la 8—9, la un consum de aer de 18—20 m³/h, capacitatea de producție a unor astfel de aparate crește de la 12—15 t/zi la 20 t/zi. Creșterea consumului de aer pînă la 40 m³/h permite creșterea capacității pînă la 25 t/zi.

Cuve de multiplicare cu sistem de distribuție a aerului dispersat (fig. 99). Aceste cuve au cea mai ridicată productivitate.

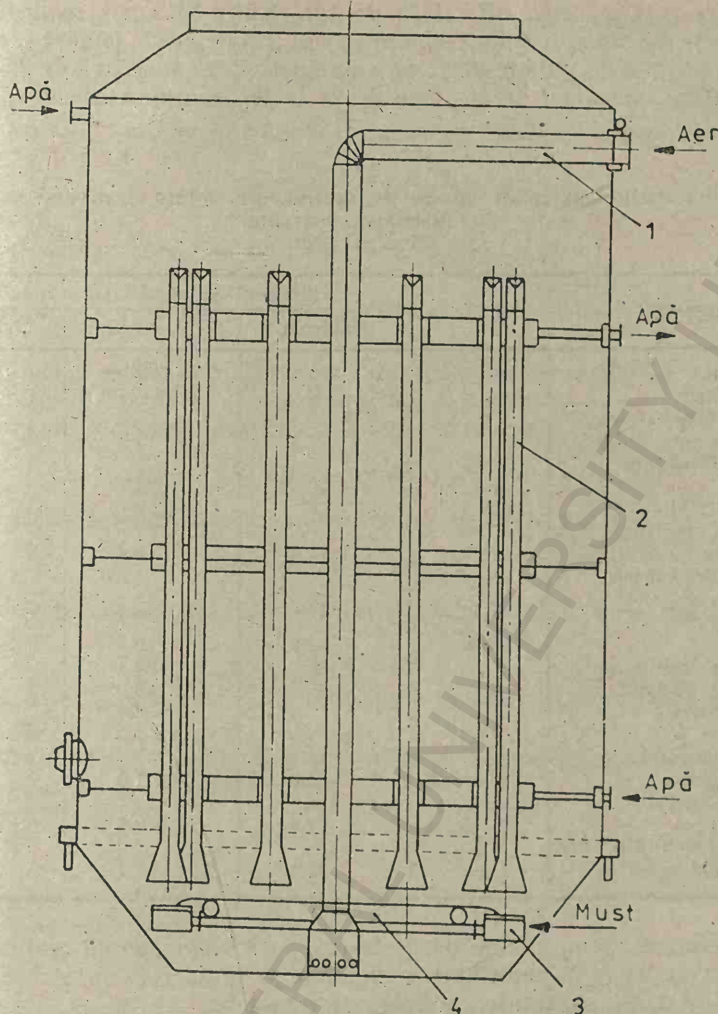


Fig. 99. Construcția cuvei de multiplicare cu sistem de distribuție a aerului dispersat :
1 — conductă de aer ; *2* — conductă de circulație ; *3* — colector de aer ; *4* — colector de mediu nutritiv.

Principala particularitate a acestei cuve este aceea că aerul alimentat prin conducta *1* cu ajutorul colectorului *3*, se distribuie uniform în 12 conducte de circulație *2* de tipul aer-lift amplasate pe circumferință, ceea ce duce la formarea unui număr corespunzător de fluxuri de circulație. Conductele aer-lift sînt dotate în partea superioară cu deflectoare și se răcesc prin manta de tipul conductă în conductă. Mediul nutritiv se introduce prin colectorul *4* în aeratorul fiecărei conducte de circulație, unde se dispersează cu formarea unui amestec de aer-lichid. Pentru această cuvă este caracteristică suprafața mărită de contact a fazelor gazoase și lichidă și ca urmare are loc o viteză de dizolvare și un coeficient de sorbție mai mare a oxigenului. Acest tip de cuvă permite prelucrarea substraturilor cu un conținut mărit de substanțe

reducătoare totale (2,5% SRT față de 1,2—1,6% SRT cît se utilizează în mod curent). La un volum de 1 250 m³, acest tip de cuvă asigură o producție zilnică de drojdie de pînă la 25 t, la o productivitate specifică de 2,5—3,0 kg drojdie/m³·h. Consumul de aer este de 28 m³/kg drojdie (tabelul 50).

Tabelul 50

Caracteristicile tehnice ale cuvelor de multiplicare, dotate cu diverse sisteme de distribuție a aerului
(Holkin, 1989)

Parametrul	U.M.	Sistemul de distribuție a aerului		
		Unizonal	Cu dispersare	Multizonal
Volum total	m³	600	600	1 300
Volum de lucru	m³	200	180—200	400
Număr de dispozitive de dispersare		1	12	8
Debit de alimentare cu must	m³	60	70	120
Producție drojdie	t/zi	8	9	20
Randament specific în drojdie	kg/m³·h	1,6	1,8	1,6
Substanțe reducătoare existente în must	kg/h	725	755	1 500
Consum aer:				
— total	m³/h	8—10	10	18—20
— m³/kg drojdie a.u.		26	28	27
— m³/m³ plămadă		45	45	46
Grad de utilizare a oxigenului	%	8—12	12—15	10
Coeficient de sorbție a oxigenului	kg O_2/m³·h	1,6	2,0	1,6
Consum de energie electrică:		1,8	0,8	0,9
— kWh/kg drojdie				
— kWh/m³ substrat		1,2	1,1	1,1

Actualmente sînt în curs de desfășurare cercetări pentru realizarea unor noi tipuri de cuve de multiplicare capabile să prelucreze substraturi cu un conținut de 4,5% substanțe reducătoare totale.

3.6.3.3. MODELAREA MATEMATICĂ A PROCESULUI DE MULTIPLICARE CONTINUĂ A DROJDIILOR

Unul dintre cele mai cunoscute domenii de aplicare ale metodelor dinamice este modelarea matematică a proceselor de creștere a populațiilor de celule.

În cazul modelelor de creștere a populațiilor de celule, ca variabile dinamice se folosesc alături de concentrațiile de substanțe organice și anorganice (substrat, enzimă, produși) și concentrația biomasei (masei celulare).

Acest concept poate fi folosit cînd numărul de celule este suficient de mare. A doua caracteristică importantă este că demersul care duce la modelul matematic este semiempiric, adică se folosesc pe larg unele legi empirice.

Modelele de creștere a microorganismelor se descriu în funcție de dependența vitezei specifice de creștere și factorii mediului înconjurător (con-

centrația substratului S, inhibitorilor I, activatorilor A_k, volumul mediului V, durata t etc.) și de rezultatele activității de viață a acestora (concentrația în biomasă x, produși inhibitori p, vîrsta și uniformitatea fiziologică a populațiilor etc.).

În general, sînt recomandate numeroase modele matematice de tip:

$$\mu = u(S, x, p, I, A_k, \text{i})$$

unde:

μ este viteza specifică de creștere a drojdiilor, h^{-1};

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \quad t = \text{durata, în ore.} \tag{219}$$

Mărimea μ este un important parametru cinetic deoarece el caracterizează viteza de creștere a fiecărei unități a biomasei.

Viteza de formare (creștere) a biomasei, în kg/h, este:

$$R_x = dx/dt = \mu x. \tag{220}$$

Viteza de transformare a substratului, în kg/h, este:

$$R_S = dS/dt = \alpha^S \mu x \tag{221}$$

unde: α^S este coeficientul de consum al substratului, în kg/kg;

$$\alpha^S = (S_0 - S)x; \tag{222}$$

unde: $S_0 > S$, concentrațiile substratului la intrare și ieșirea din fermentator, în kg/m³.

Randamentul în biomasă y (coeficientul economic) se determină în raport cu substratul consumat:

$$y = \frac{x}{S_0 - S} = \frac{1}{\alpha^S}. \tag{223}$$

În industria drojdiilor furajere, randamentul, în %, se determină în raport de substanțele reducătoare totale utilizate:

$$y = (x/\Delta C_{SRT})\cdot 100 \tag{224}$$

unde: C_{SRT} este diferența dintre concentrația în substanțe reducătoare totale în mustul de alimentare și concentrația în substanțe reducătoare totale din borhot.

La cultivarea unor tipuri de drojdii furajere productive, se poate ajunge la randamente de 55—60%, față de substanțele reducătoare totale.

Substratul asimilat $\Delta S = S_0 - S$ este utilizat pentru formarea biomasei ΔS_b și pentru menținerea viabilității microorganismelor ΔS_m. În aceste condiții, randamentul y se poate scrie:

$$y = \frac{x}{\Delta S_b + \Delta S_m}. \tag{225}$$

Consumul de substrat pentru menținerea viabilității microorganismelor este de 0,03 kg SRT/kg drojdie s.u., pentru un ciclu de fermentare de 3—4 ore.

Activitatea fiziologică a drojdiilor, q, se caracterizează prin cantitatea de substrat ΔS utilizată pentru o unitate de biomasă Δx, în unitatea de timp.

$$q = \frac{\Delta S}{\Delta x t}. \tag{226}$$

Creşterea biomasei depinde de cantitatea de substrat asimilat, astfel:

$$\Delta x = f(\Delta S). \quad (227)$$

Cu creşterea concentraţiei substratului S_0, viteza specifică de creştere a drojdiilor μ se măreşte pînă la valoarea maximă, μ_{max}, după care începe să scadă. Pe baza principalilor parametri se poate stabili bilanţul de materiale la producerea biomasei:

$$v\,dx/dt = Vx_0 + \mu(S, xC_L)xv - vx \quad (228)$$

unde: $v\,dx/dt$ este viteza de modificare a concentraţiei biomasei;
vx_0 — viteza de formare a biomasei;
x_0 — concentraţia biomasei în plămadă;
vx — viteza de evacuare a biomasei din fermentator;

$$v\,dS/dt = vS_0 - \alpha^S\mu(S, x, C_L)v_x - vS \quad (229)$$

unde: $v\,dS/dt$ este viteza de modificare a concentraţiei substratului;
— vS_0 — viteza de alimentrae;
— $\mu(S_0, x, C_1)vX$ — viteza de utilizare a substratului de către drojdii;
— vS_0 — viteza de evacuare a substratului.

Dependenţele cinetice permit determinarea principalilor parametri de lucru ai fermentatoarelor, în cazul cultivării continue a drojdiilor asporogene: viteza de alimentare v, pentru un anumit volum V al fermentatorului; productivitatea aparatului G; concentraţia în biomasă x şi substrat S; randamentul în biomasă y.

Pentru stabilirea dependenţei vitezei specifice de creştere a microorganismelor μ, faţă de substratul limitat S, sau de produşii inhibitori p, s-au propus o serie de modele cinetice, modele derivate de la ecuaţia lui Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S}, \quad (230)$$

unde: μ_m este viteza specifică maximă de creştere a drojdiilor;
K_S — constanta care corespunde concentraţiei substratului cînd $\mu = 0{,}5\mu_{max}$.

Prin folosirea acestei funcţii, relaţiile din dinamica populaţiilor de microorganisme unicelulare sînt analoage cu relaţiile din cinetica enzimatică. Acest lucru nu este întîmplător, la baza activităţii celulare avînd reacţiile enzimatice.

Neajunsul principal al modelului Monod este că nu ia în consideraţie inhibarea de către produsele de metabolism, inhibarea de către substrat etc. (Stanciu, 1975).

Pentru stabilirea influenţei asupra vitezei de fermentaţie a produselor de metabolism, se foloseşte ecuaţia Monod-Ierusalimski:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_S + S)(1 + p/K_p)} \quad (231)$$

unde: p este concentraţia inhbitorului;
K_p — constanta care caracterizează reducerea vitezei de creştere datorită produselor de metabolism.

Valoarea μ_{max} se determină pe baza modificării concentraţiei în biomasă în unitate de timp, în faza exponenţială de creştere.

În fermentatoarele industriale, cultivarea continuă a drojdiilor, în condiții staționare, are loc la : x, S, v, V = constant, $V_0 = V$, iar concentrația substratului în finalul procesului trebuie să fie minimă ($S \to 0$).

Ecuațiile 227, 228, 229 pentru un proces staționar ($Vdx/dt = 0$, $VdS/dt = 0$) și la o concentrație inițială în biomasă permit calcularea valorilor pentru concentrația în biomasa x și ale substratului S.

$$x = \frac{1}{\alpha^S}\left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right); \tag{232}$$

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}, \tag{233}$$

unde : D este viteza de alimentare (debitul de alimentare sau de ieșire din fermentator) ;

$$D = v/V = 1/\bar{t}, \tag{234}$$

unde : t este durata medie de fermentare, h.

Prin creșterea duratei $\bar{t}$ (3—4 ore în timpul fermentării continue) crește și valoarea ΔS. La cultura continuă cantitatea de biomasă evacuată x trebuie să fie compensată de creșterea biomasei :

$$\mu x = Dx \quad \text{sau} \quad \mu = D.$$

Această egalitate reprezintă o condiție importantă pentru un proces staționar de cultivare continuă a drojdiilor.

La $\mu > D$ viteza de creștere a drojdiilor este mai mare decît viteza de alimentare și în acest caz drojdiile nu sînt asigurate cu cantitatea necesară de substrat. La $\mu < D$ viteza de alimentare este mai mare decît viteza de creștere a drojdiilor și în acest caz drojdiile nu pot asimila în întregime zaharurile, crescînd valoarea conținutului de zaharuri reziduale (S). Cu creșterea valorii S se mărește și valoarea μ și procesul intră într-un nou regim staționar. Un indicator important care caracterizează procesul de cultivare continuă a drojdiilor este productivitatea culurii (sau productivitatea specifică a cuvei de multiplicare), G, care se exprimă în kg drojdie/m³·h :

$$G = Dx = Dy(S_0 - S). \tag{235}$$

La $D = \mu$;

$$G = \mu x. \tag{236}$$

Productivitatea maximă a fermentatorului se calculează pe baza valorilor optime ale vitezei de alimentare, D_{opt}, de concentrația substratului S_{opt} și a biomasei x_{opt} (Holkin, 1989) :

$$D_{opt} = \mu_{max}(1 - \sqrt{K_S/(K_S + S_0)}; \tag{237}$$

$$S_{opt} = K_S(1/\sqrt{K_S/(K_S + S_0)} - 1); \tag{238}$$

$$x_{opt} = 1/\alpha^S(S_0 - \sqrt{(S_0 + K_S)K_S} + K_S). \tag{239}$$

În condițiile cultivării continue la $D = 0{,}2-0{,}3$ h⁻¹, $C_{SRT} = 1{,}2-2\%$, $X = 7-10$ kg/m³, drojdiile selecționate productive au o productivitate de 2—4 kg/m³·h. În mod obișnuit policulturile de drojdie dau o productivitate de 1—2 kg/m³ h.

3.6.4. SEPARAREA ȘI SPĂLAREA DROJDIILOR FURAJERE

În decursul procesului de multiplicare a drojdiei, datorită prezenței unor substanțe tensioactive în mediu și a contactului dintre masa proteică fină a drojdiei cu aerul, apare o tendință puternică de spumare. Premergător separării și spălării drojdiilor furajere se realizează dezemulsionarea emulsiei cu drojdii, fază absolut necesară deoarece prezența spumei în masa de lichid conduce la scăderea randamentului separatoarelor centrifugale și la pierderi de drojdie.

Distrugerea emulsiei, respectiv dezemulsionarea, poate fi accelerată atît prin metode fizice cît și prin metode chimice. Dezemulsionarea este dependentă în principal de capacitatea de spumare a substratului supus multiplicării.

Studii complexe privind capacitatea de spumare a diverselor substraturi utilizate în cultura drojdiilor furajere au fost efectuate de H e r c z e g h (1991).

Tabelul 51 prezintă comparativ capacitatea de spumare a diverselor substraturi utilizate pentru multiplicarea drojdiilor furajere (prehidrolizatul din fag, soluție sulfit de amoniu din fag, soluție sulfit de calciu din rășinoase),

Tabelul 51

Capacitatea de spumare a diverselor substraturi pentru multiplicarea drojdiilor furajere, funcție de conținutul de substanță uscată

Temperatura, °C	Conținut în s.u., %	Capacitatea de spumare, *K*		
		Prehidrolizat din fag	Soluție sulfit de amoniu din fag	Soluție sulfit de calciu din rășinoase
20	0,5	1,50	1,75	0,50
50	0,5	1,64	2,00	1,25
80	0,5	1,85	3,80	1,75
20	1,0	1,75	3,00	1,75
50	1,0	1,82	3,70	2,00
80	1,0	2,00	4,00	2,50
20	1,5	1,80	3,75	2,00
50	1,5	1,95	4,50	2,30
80	1,5	2,25	5,00	2,75
20	2,0	2,15	4,25	2,30
50	2,0	2,25	4,75	2,50
80	2,0	2,55	5,80	3,00
20	2,5	2,25	4,50	2,50
50	2,5	2,35	5,00	2,80
80	2,5	2,55	5,75	3,25
200	5,0	2,30	5,25	2,75
50	5,0	2,50	5,60	3,00
80	5,0	2,75	6,00	3,50
20	10,0	—	5,50	3,00
50	10,0	—	5,75	3,30
80	10,0	—	6,25	3,60
20	13,0	—	5,50	3,00
50	13,0	—	5,75	—
80	13,0	—	6,25	3,60

funcție de conținutul de substanță uscată și temperatură. Din datele prezentate în tabel constatăm că soluțiile reziduale din lemn de foioase prezintă o capacitate de spumare superioară soluțiilor reziduale din lemn de rășinoase, capacitate care crește cu temperatura.

Dintre metodele fizice de dezemulsionare cele mai importante sînt:

— trecerea unui curent continuu sau alternativ prin spumă (metoda Cotrell);

— filtrarea și centrifugarea spumei;

— supunerea unei operații de curgere pe un plan înclinat, al cărui unghi se determină în funcție de stabilitatea ei;

Metodele chimice de dezemulsionare se bazează pe folosirea antispumanților. Antispumanții acționează sub formă de pelicule pe suprafața lichidului sau se amestecă cu plămada, micșorînd tensiunea superficială a acesteia. În prima categorie intră uleiurile vegetale, iar în a doua antispumanții sub formă de uleiuri siliconice, hidrocarburi parafinice, alcooli și acizi grași superiori (C_{20}—C_{28}), ciclohexan, tricloretilenă.

Indiferent de modul cum se face dezemulsionarea, fizic, chimic sau combinat, pentru fabricarea drojdiilor furajere este absolut necesar ca întreaga cantitate de spumă să fie eliminată din sistem.

Figura 100 prezintă fluxul tehnologic de dezemulsionare, separare și spălare a drojdiilor.

Operațiunea de separare a drojdiilor se realizează cu ajutorul separatoarelor centrifugale de turație mare (4 000—5 000 rot./min) cu talere.

În treapta I separarea se face cu patru separatoare, dintre care trei sînt în funcțiune, iar al patrulea este în rezervă. Crema de drojdie rezultată în urma primei separări este colectată într-un rezervor prevăzut cu un agitator tip elice, în care se face spălarea cu apa rezultată la separarea a III-a. Instalația este prevăzută cu două rezervoare de acest tip, colectarea în ele făcîndu-se alternativ. Borhotul rezultat la separarea I este evacuat la canal, după ce în prealabil a fost neutralizat sau poate fi utilizat la fabricarea produșilor lignosulfonici sau la diluarea mustului pentru fermentare.

Crema de drojdie obținută la separarea I are o concentrație de 4,5—6%. Cantitatea de apă necesară primei spălări se calculează în funcție de concentrația și de volumul cremei de drojdie colectat, pentru ca în final să se obțină, după prima spălare, o concentrație în drojdie de 1,8%.

După efectuarea primei spălări, se trece la separarea a II-a, care se face cu trei separatoare, unul din acestea fiind de rezervă. Crema rezultată la această separare este colectată într-un rezervor și spălată cu apă curată, sub o puternică agitare, ca și în cazul primei spălări, pînă cînd pasta rămîne cu o consistență de 4%.

Amestecul de borhot și apă rezultat la separarea a II-a este evacuat direct la canal, avînd în cazul leșiilor sulfitice reziduale un $pH = 6,5$ și un conținut în substanță uscată de 15—18 g/l, ceea ce îl face inapt pentru valorificarea ulterioară.

Drojdia spălată, avînd o consistență de 4%, este trecută la separarea a III-a, care se execută cu aceleași separatoare cu care se face și separarea a II-a, aceste separări făcîndu-se alternativ. Apa de la această separare, deși conține drojdie în proporție de 0,8—1%, este recirculată ca apă de spălare după separarea I.

Crema colectată în acest caz trebuie să aibă o concentrație de $12,5 \pm 5\%$, pentru a nu se produce dereglări în procesul de iradiere și evaporare.

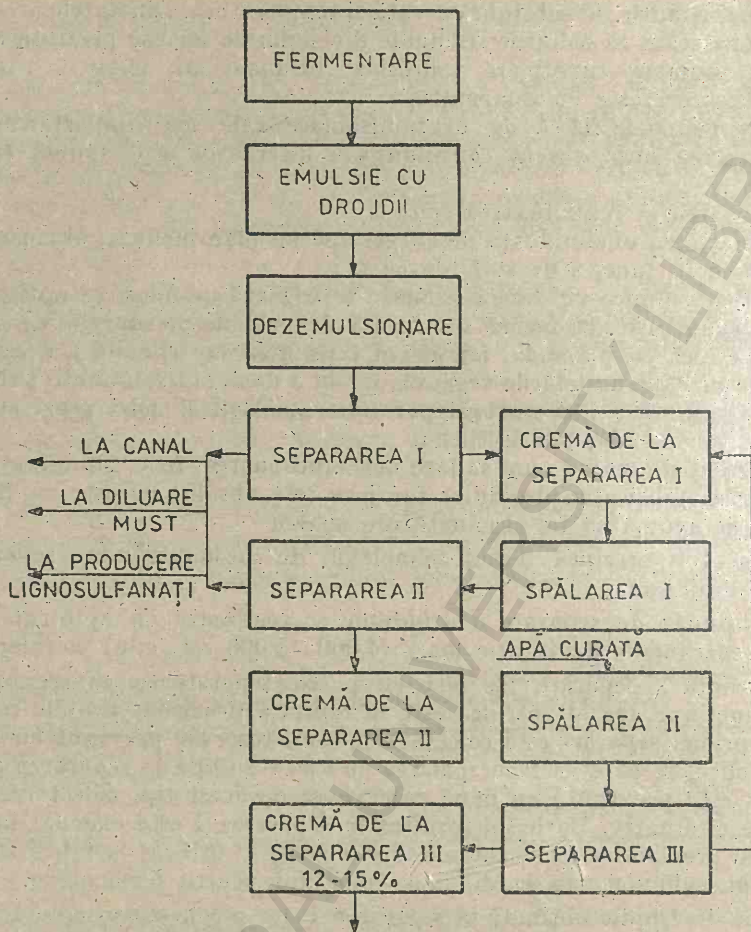


Fig. 100. Fluxul tehnologic al dezemulsionării, separării și spălării drojdiilor.

Dacă operațiile procesului de spălare nu se execută corect, atunci, în pasta de drojdie de la separarea a III-a, rămîn cantități apreciabile de lignosulfonați, care duc la obținerea unei drojdii cu indici calitativi scăzuți. De asemenea, lignosulfonații prezenți în drojdie îi schimbă gustul, iar conținutul de proteine scade, diminuînd astfel valoarea nutritivă a drojdiei.

În ultimul timp, în practica separării drojdiilor, se folosește metoda flotării cu aer a celulelor de drojdie. Flotarea realizează separarea drojdiilor prin spumarea plămezii cu ajutorul aerului (prin aerare).

Capacitatea de flotare a drojdiilor depinde de substanțele tensioactive din lichid, de conținutul de apă liberă și legată în drojdii, de conținutul de ioni de calciu (pentru specia *Candida utilis)* și al polizaharidelor (pentru specia *Candida tropicalis)* din celule (Rozmarin, 1970, Usatova, 1974).

S-a constatat că tipul drojdiilor influențează capacitatea de flotare a acestora. Astfel, în seria *Candida scottii, Candida tropicalis Candida utilis, Zigaphbospora marxiana,* capacitatea de flotare scade de la 100W pentru primul

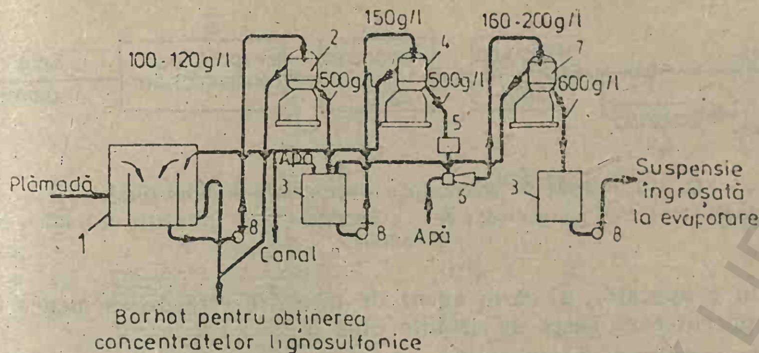


Fig. 101. Schema tehnologică de separare a drojdiilor din plămezile pe bază de soluții sulfitice reziduale:

1 — flotator; *2* — grupa I de separare; *3* — colector de suspensie de drojdie; *4* — grupa a II-a de separare; *5* — vas tampon; *6* — pompă de injecție cu apă; *7* — grupa a III-a de separare; *8* — pompe.

tip, la zero pentru ultimul tip (Bobarenko și colaboratorii, 1973). Această capacitate de flotare diferită a fost corelată cu conținutul de polizaharide și de chitină din membrana celulelor de drojdie.

În fig. 101 se prezintă o schemă tehnologică de separare a drojdiilor din plămezile pe baza de soluții sulfitice reziduale, în care se face mai întîi o concentrare prealabilă, trecînd plămada prin flotator.

Plămada intră la separarea primară în flotator, după care suspensia de drojdie din cilindrul central al flotatorului se trimite cu pompa la grupa întîi de separare, de unde lichidul epuizat reunit cu borhotul de la flotator se trimite la prelucrarea pe concentrate lignosulfonice. Suspensia îngroșată trece în colectorul de suspensie pentru spălarea I, apoi la treapta a doua de separare, de aici lichidul epuizat se recirculă la flotator, pentru recuperarea drojdiilor, iar suspensia după spălare intermediară se trimite la cea de a treia treaptă de separare.

3.6.5. CONCENTRAREA ȘI USCAREA DROJDIILOR FURAJERE

Pasta de drojdie rezultată la separarea a treia cu un conținut de drojdie de $12{,}5 \pm 0{,}5\%$ este pompată către instalația de evaporare, unde are loc creșterea concentrației în drojdie la $24 \pm 1\%$.

Pentru evaporarea pastei de drojdie se folosește o serie întreagă de instalații, cea mai bună fiind considerată aceea care asigură o temperatură de lucru de maximum 70°C. Peste această limită există pericolul diminuării calitative a drojdiilor prin pierderea unei cantități importante din vitamina D.

Schema de principiu a unei instalații de evaporare este redată în fig. 102 și se compune din următoarele:

— un schimbător de căldură preîncălzitor care ridică, cu ajutorul aburului, temperatura pastei de drojdie la 70°C;

— un plasmolizor prin care circulă pasta de drojdie la temperatura de 70°C și unde este menținută 3 min. Introducerea drojdiilor plasmolizate în evaporatoare exclude formarea de aglomerări ce influențează negativ procesul evaporării;

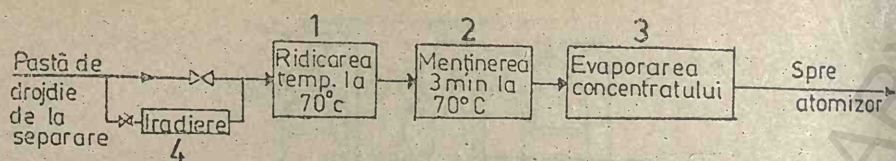


Fig. 102. Schema de principiu a concentrării drojdiei furajere: *1* — preîncălzitor; *2* — plasmolizor; *3* — evaporator; *4* — instalație de iradiere cu raze ultraviolete.

— un evaporator, al cărui agent de încălzire este de asemenea aburul și care concentrează pasta de drojdie pînă la 24±1%.

De la instalația de evaporare, pasta de drojdie este pompată mai departe către instalația de uscare prin atomizare. Pasta de drojdie înainte de a intra în schimbătorul de căldură poate fi trecută printr-o instalație de iradiere cu radiații ultraviolete, în scopul îmbogățirii drojdiei în vitamina D.

Drojdia furajeră are o cantitate apreciabilă de ergosterol, care poate fi transformat în întregime în vitamina D, prin iradiere cu raze ultraviolete. Prin metoda iradierii, se poate mări într-o măsură însemnată conținutul de vitamină în drojdiile furajere. Conținutul de vitamine dintr-un gram de drojdii iradiate ajunge la 8—10 mii unități internaționale. În amestecurile furajere pentru păsări se cere un adaos de drojdii care să conțină 1 000 u.i. la 1 g substanță uscată, iar pentru animale 100 u.i.

3.6.5.1. INSTALAȚIA DE CONCENTRARE

În fig. 103 se prezintă schema instalației de concentrare.

Pasta de drojdie de la instalația de separare este colectată în rezervorul *1*, iar de aici, cu ajutorul pompei volumice *2*, este trimisă în preîncălzitorul *3*. În preîncălzitorul *3* are loc încălzirea pastei de drojdie pînă la temperatura de 70°C, cu ajutorul aburului de la termocompensatorul *9*. Capacele acestui condensator sînt șicanate astfel încît să se realizeze schimbările de sens ale circuitului de pastă de drojdie. După cum se poate observa din fig. 104, condensatul se adună la partea inferioară a preîncălzitorului și de aici, printr-un racord, trece gravitațional în condensatorul de amestec *8*.

Din preîncălzitor la tempetatura de 70°C, pasta de drojdie trece în plasmolizorul *4* alcătuit din două corpuri montate în serie a căror lungime este astfel calculată încît pasta de drojdie să fie menținută 3 min, timp necesar pentru realizarea fenomenului de plasmoliză, care constă în plesnirea membranelor celulare din celulele de drojdie.

După plasmolizor, pasta de drojdie intră în evaporatorul propriu-zis al instalației *5*, tot un schimbător de căldură, în care alimentarea cu abur se face de la același termocompresor ca și la preîncălzitorul 3; evaporatorul are însă la partea inferioară o cuvă separatoare. Pasta de drojdie se repartizează sub formă de peliculă subțire pe peretele interior al tuburilor de încălzire, astfel încît apa se evaporă repede.

Pasta de drojdie concentrată antrenează în separator și vapori de apă care, la rîndul lor, sînt ejectați de termocompresor. Consumul de abur al acestei instalații este de 810 kg/h la o presiune de 6 bar.

Lichidul concentrat este apoi preluat din separatorul evaporatorului cu o pompă volumică și trimis la rezervoarele de alimentare a atomizorului.

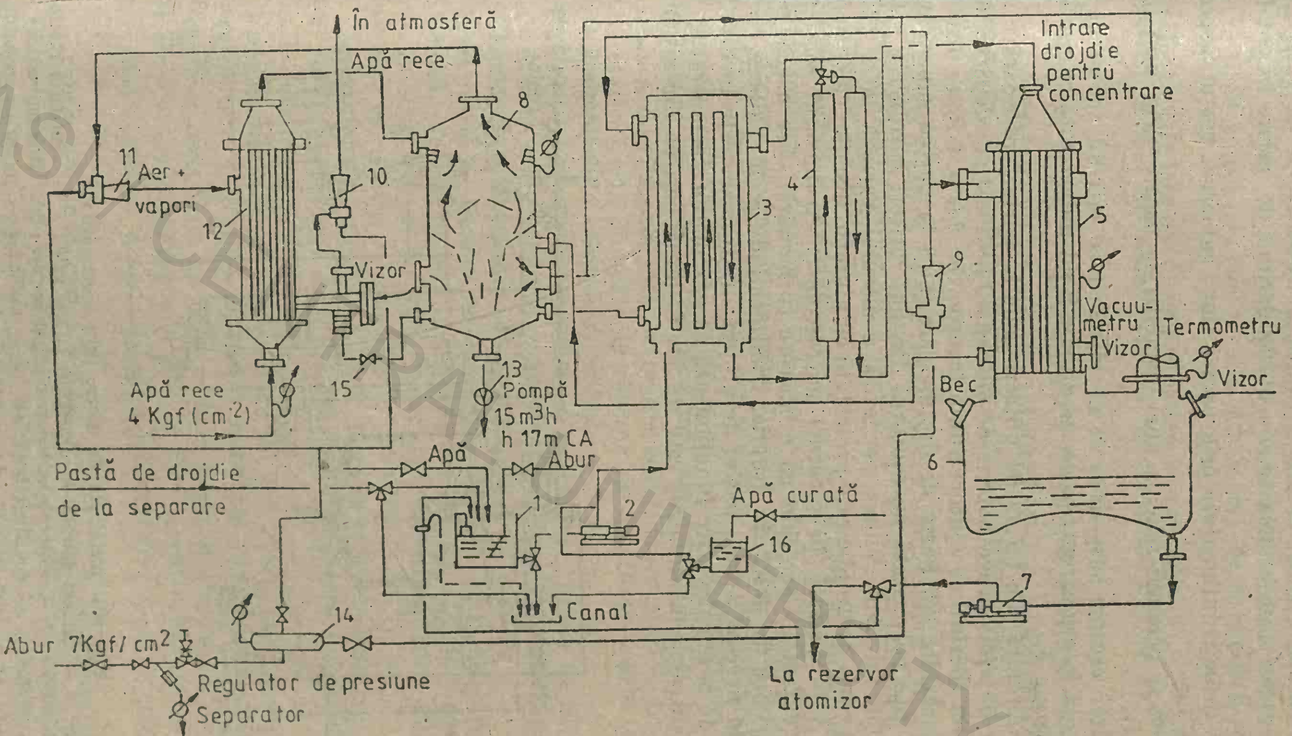


Fig. 103. Schema instalației de concentrare:

1 — rezervor de pastă de drojdie; *2* — pompă volumică; *3* — preincălzitor; *4* — plasmolizor; *5* — evaporator; *6* — separator; *7* — pompă volumică; *8* — condensator de amestec; *9* — termocompresor; *10, 11* — ejector de abur; *12* — condensator intermediar; *13* — pompă centrifugală; *14* — distribuitor de abur; *15* — vană de reglaj; *16* — rezervor de apă pentru spălarea instalației.

3.6.5.2. INSTALAŢIA DE USCARE PRIN ATOMIZARE

Drojdiile furajere pot fi uscate cu ajutorul uscătoarelor cu valţuri, instalaţiilor de uscare prin atomizare sau al instalaţiilor de uscare în pat fluidizat (Egorov, 1981).

Calităţile drojdiei influenţate prin uscare sînt : culoarea, gustul, aspectul şi umiditatea lor.

În fig. 104 se prezintă schema unei instalaţii de uscare prin atomizare (Cristea, 1964).

În atomizor uscarea suspensiei de drojdie se face într-un curent de aer cald care circulă în echicurent, pasta de drojdie fiind pulverizată cu ajutorul unui disc rotitior *5*.

Drojdia obţinută sub formă de pulbere cade la partea inferioară a atomizorului, iar de acolo într-o baterie de cicloane *14*, *17* şi mai departe în silozurile 20. Din silozuri, cu ajutorul unui transportor *21*, se trimite direct la aparatul de însăcuire *22*. Pasta de drojdie care intră la partea superioară a atomizorului este pulverizată cu ajutorul discului rotitor, care are o viteză de 6 000—7 000 rot./min. Viteza periferică a discului variază între 125 şi 150 m/s. Suspensia de drojdie este proiectată cu ajutorul discului către pereţii atomizorului şi dispersată în picături microscopice. Atomizorul este traversat de un curent de aer cald cu o mişcare turbionară, care usucă picăturile microscopice de pastă de drojdie, transformîndu-le în pulbere.

Aerul cald necesar uscării pastei de drojdie în atomizor este furnizat de un generator de gaze calde care funcţionează cu gaz metan. Temperatura aerului cald la intrarea în atomizor este de 300°C, iar la ieşirea din atomizor 100°C.

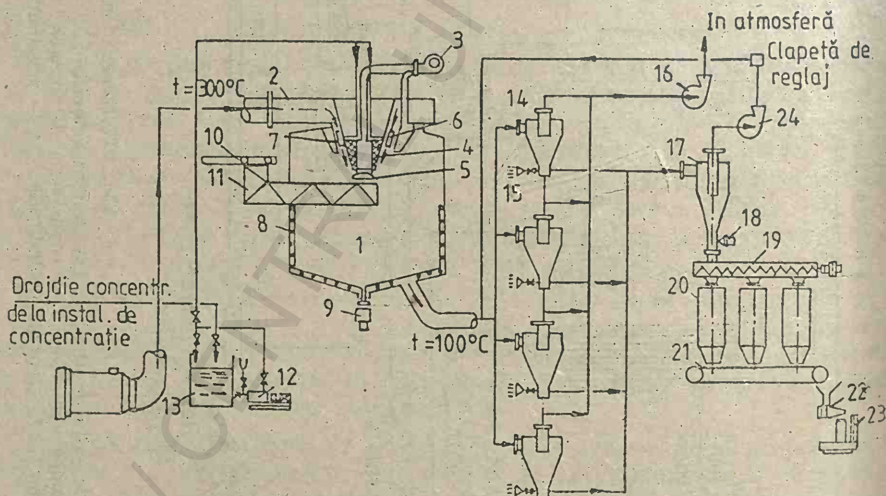


Fig. 104. Instalaţia de uscare prin atomizare :

1 — atomizor ; *2* — carcasă spirală de alimentare cu aer cald ; *3* — ventilator răcire motor disc pulverizare ; *4* — motor de acţionare disc pulverizare ; *5* — disc pulverizare ; *6* — paletaj director ; *7* — con distribuţie aer ; *8* — rador ; *9* — motor cu reductor acţionare raclor ; *10* — şină ghidare ; *11* — pasarele de acces la discul pulverizator ; *12* — pompă volumică ; *13* — rezervor colector pentru pasta de drojdie concentrată ; *14* — ciclon ; *15* — dispozitiv admisie aer proaspăt ; *16* — ventilator aer centrifugal ; *17* — ciclon ; *18* — dispozitiv dozare ; *19* — transportor elicoidal ; *20* — silozuri de depozitare ; *21* — transportor cu plăci metalice ; *22* — dispozitiv de încărcat sacii ; *23* — cîntar automat ; *24* — ventilator centrifugal ; *25* — generator de aer cald.

Calitatea uscării depinde de modul de pulverizare a suspensiei de drojdie i de menținerea cît mai constantă a temperaturii aerului cald.

În atomizor evaporarea apei din lichidul sub formă de picături se face ntr-un timp foarte scurt, astfel încît gazele calde nu pot influența negativ alitatea produsulu nici cînd se află sub formă de lichid și nici în timpul iscării.

Pulberea care iese din atomizor păstrează calitățile primare ale produsului lin toate punctele de vedere, aromă și conținut în vitamine.

3.7. SCHEME TEHNOLOGICE PENTRU FABRICAREA DROJDIEI FURAJERE UTILIZÎND CA SUBSTRAT LEȘIILE SULFITICE REZIDUALE ȘI PREHIDROLIZATELE

Figura 105 prezintă schema tehnologică a unei instalații industriale pentru fabricarea drojdiei furajere după procedeul Lefrancois, utilizînd ca substrat leșiile sulfitice reziduale.

Leșiile sulfitice reziduale, pentru a fi utilizate ca substrat în cultura drojdiilor furajere, suferă o serie de tratamente preliminare care sînt fundamentale. Înainte de desulfitare leșia sulfitică reziduală recuperată de la spălarea celulozei este pompată într-un rezervor, prin intermediul unui filtru rotativ pentru reținerea fibrelor de celuloză, amplasat deasupra rezervorului (nu se admite un conținut de fibră mai mare de 0,5 g/l).

Leșia reziduală colectată cu temperatura de circa 60°C prin intermediul filtrului static *1* este pompată în coloana de desufitare *3* prin intermediul a trei schimbătoare de căldură *2*.

După trecerea prin schimbătoarele de căldură *2* leșia își ridică temperatura de la circa 60°C, utilizînd ca agent de încălzire leșia desulfitată, care iese din coloana cu temperatura de circa 104°C.

Leșia intră în coloana de desulfitare *3* pe la partea superioară și străbate coloana de sus în jos. În coloană se introduce pe la partea inferioară lateral, în contracurent cu leșia, aburul care antrenează cea mai mare parte a dioxidului de sulf și a substanțelor volatile.

Vaporii de apă, dioxidul de sulf și substanțele volatile sînt condensate parțial în condensatorul *4* iar condensatorul (conține 15—20 g/l SO_2) este trimis la albire (ca agent anticlor).

Leșia desulfitată, cu temperatura de 60...70°C, se trimite la instalația de neutralizare și tratare cu săruri nutritive care constă din :

— cinci rezervoare în care se face neutralizarea și tratarea cu săruri nutritive *6* și trei rezervoare în care se face stocarea leșiei tratate *7* ;

— stația pentru dizolvarea sărurilor nutritive *8* și prepararea laptelui de var *9* ;

— rezervoare de stocare a laptelui de var *10* și a amoniacului *11*.

După neutralizare și adăugarea sărurilot nutritive urmează decantarea leșiei timp de 8—10 ore și stocarea leșiei decantate în cele trei rezervoare de stocare *7*.

Leșia din rezervoarele de stocare *7* este trecută prin două schimbătoare de căldură cu plăci *12* pentru a fi adusă la temperatura de multiplicare de 36±1°C prin răcire cu apă.

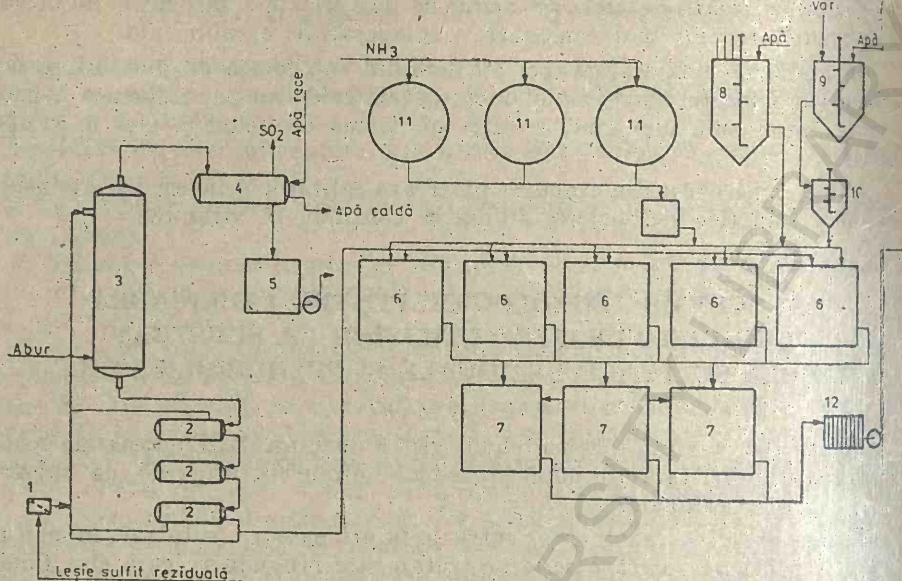


Fig. 105. Schemă tehnologică de fabricare a
1 — filtru static ; 2 — schimbătoare de căldură ; 3 — coloană de desulfitare ; 4 — schimbă-
nutritive ; 7 — rezervoare cu must decantat ; 8 — rezervor pregătire nutrienți ; 9, 10 — rezer-
căldură cu plăci ; 13 — lin pentru multiplicare ; 14 — cuvă de dezemulsionare ; 15, 16 — sepa-
21 — evaporator ; 22 — re-

După răcire, leșia este trecută într-un rezervor de nivel constant de unde se face alimentarea celor două cuve de multiplicare 13. La ieșirea din cuvele de multiplicare, mustul are multă spumă care este distrusă cu ajutorul acizilor grași ($C_{18}—C_{22}$), ca antispumanți, în cuva de dezemulsionare 14. Mustul dezemulsionat este supus la trei treceri succesive prin separatoarele centrifugale 15 și 16, iar între aceste separări se efectuează cele două spălări intermediare.

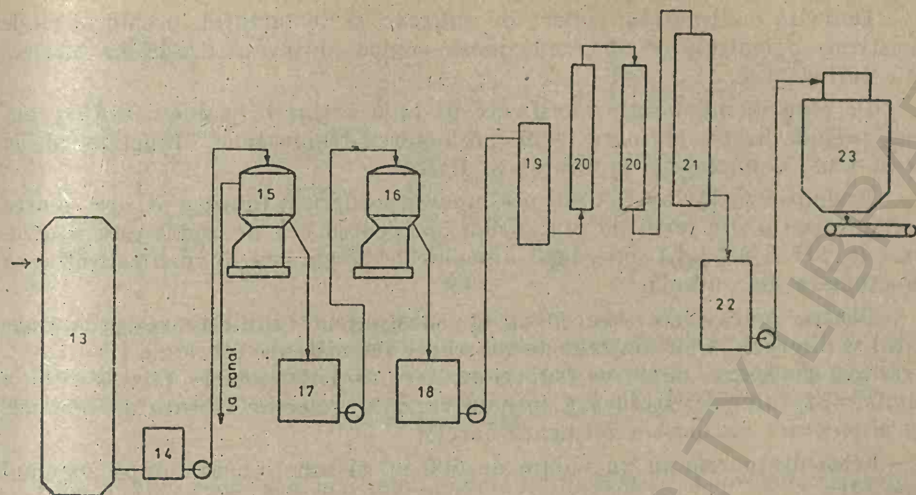
După ultima treaptă de separare centrifguală, concentrația cremei de drojdie este de 13—15%. Crema de drojdie după ce suferă faza de plasmoliză trece la faza de concentrare prin evaporare 21, unde se realizează o concentrație a cremei de circa 25%. Crema de drojdie, obținută după evaporare, este trecută la instalația de uscare prin atomizare 23. Uscarea se face cu aer cald (310...325°C), care circulă în echicurent cu crema de drojdie concentrată. În final, umiditatea maximă a drojdiei este de 10%.

După atomizare, drojdia sub formă de praf fin maro-gălbui este trecută la stația de însăcuire și cîntărire automată.

La Torrelarego-Spania în 1964 s-a pus în funcțiune o instalație de fabricare a drojdiei furajere din leșiile bisulfit de calciu provenite de la prelucrarea lemnului de eucalipt (Huber, 1966).

Mirosul, gustul și compoziția drojdiei fabricate din leșia reziduală de eucalipt corespund drojdiei furajere obținute din leșie din lemn de fag.

Pe linia îmbunătățirii pregătirii leșiilor sulfitice reziduale, pentru fabricarea drojdiilor furajere, se remarcă și utilizarea procesului de ultrafiltrare (Babușkina și colab., 1985). În tabelul 52 sînt prezentate rezultatele fermen-



drojdiei furajere din leșiile sulfitice reziduale:
tor de căldură; 5 — rezervor condens; 6 — rezervoare de neutralizare-tratare cu săruri
voare de pregătire lapte de var; 11 — rezervoare depozitare amoniac; 12 — schimbător de
ratoare centrifugale; 17, 19 — rezervoare; 19 — schimbător de căldură; 20 — plasmolizor;
zervor; 23 — atomizor.

tării discontinue și continue a ultrafiltrului (fracțiunea de zaharuri, acizi organici, acizi lignosulfonici cu greutate moleculară mică), comparativ cu leșiile sulfitice reziduale inițiale. Specia de drojdie utilizată a fost *Candida utilis*.

Din datele tabelului 52 se remarcă influența favorabilă a procesului de ultrafiltrare asupra calității biologice a leșiilor sulfitice reziduale și implicit asupra parametrilor procesului de multiplicare (grad de utilizare a substanțelor reducătoare totale, randament față de substanțe reducătoare totale, conținut de proteine).

Tabelul 52

Rezultatele fermentării ultrafiltratului comparativ cu leșiile sulfitice reziduale
(Babușkina și colab., 1985)

Indicatori	Fermentare discontinuă		Fermentare continuă	
	Soluție reziduală inițială	Ultrafiltrat	Soluție reziduală inițială	Ultrafiltrat
Conținut de proteine, %	46,1	53,1	59,5	61,5
Randament față de substanțe reducătoare totale, %	40,5	52,2	38,9	63,0
Grad de utilizare a substanțelor reducătoare totale, %	69,0	79,2	63,3	79,2

Datorită conținutului ridicat de zaharuri și de furfurol, prehidrolizatele constituie o materie primă avantajoasă pentru obținerea drojdiilor furajere și a furfurolului.

Pe plan mondial sînt valorificate pe linia obținerii drojdiei furajere numai prehidrolizate obținute prin prelucrarea rășinoaselor, funcționînd, în acest sens, două fabrici la Bratsk și Baical.

Prehidrolizatul invertit la presiune atmosferică (durata 8 ore pentru prehidrolizatul din lemn de pin și 9,5 ore pentru cea de zadă) este neutralizat la $pH = 3,9-4,1$ cu soluții amoniacale 25%, într-un neutralizator cu funcționare discontinuă.

Pentru micșorarea concentrației substanțelor inhibitoare prehidrolizatul se diluează la un conținut de substanțe reducătoare totale de 1,3—1,5%. Tratarea cu săruri nutritive (superfosfat, clorură de potasiu etc.) și diluția prehidrolizatului se efectuează într-un rezervor colector înainte de pompele de alimentare cu must a fermentatoarelor.

Fermentatoarele au un volum de 600 m^3 și funcționează după sistemul „aer-lift".

Caracteristicile mustului și parametrii tehnologici de fermentare sînt prezentați în tabelul 53. Suspensia de drojdie în prima fază este separată prin flotare, în flotatoare, într-o singură treaptă, unde are loc o îngroșare a suspensiei de drojdie de 2,0—2,5 ori.

Tabelul 53

Caracteristicile mustului și parametrii de fermentare ai prehidrolizatului din lemn de rășinoase

Caracteristicile mustului					Parametrii de fermentare						
SRT %	pH	P_2O_5 mg/l	Furfurol %	Azot mg/l	Volum util, m	Debit, m^3	pH	Temperatură, °C	Conc. în drojdie, g/l	SRT rezidual, %	Randament în drojdie, %
1,3—1,4	3,8	340	0,04—0,05	1 200	160	35—40	4,0	38	30	0,14	52,00

Concentrarea drojdiei la o concentrație de 450—500 g/l se face prin separare centrifugală în două trepte. După faza de separare centrifugală, urmează faza de evaporare, care concentrează suspensia de drojdie de la 10 la 16%. Uscarea drojdiei se face prin atomizare (producția 1,5 t drojdie/h).

În ceea ce privește valorificarea prehidrolizatului din lemn de foioase, pentru prima oară în lume s-a realizat la S.C. Celohart Donaris S.A. Brăila o instalație industrială de fabricare a drojdiei furajere care valorifică prehidrolizatul provenit de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag, pe linia obținerii drojdiei furajere.

Pentru prehidrolizatul din lemn de mesteacăn, cercetătorii ruși propun o schemă tehnologică de pregătire a prehidrolizatului pentru valorificarea acestuia pe drojdie furajeră și furfurol (Orlov Jigalov, 1987).

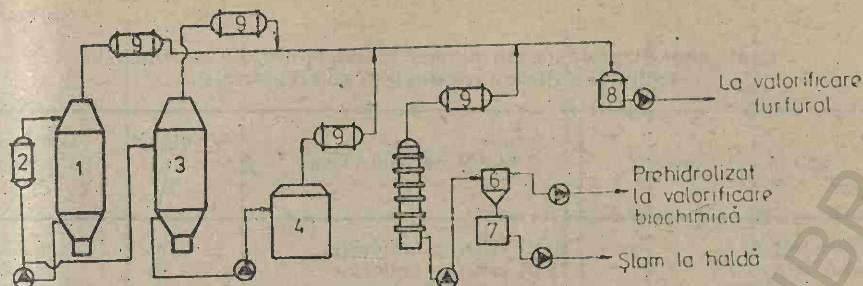


Fig. 106. Schema tehnologică de pregătire a prehodrolizatului din lemn de mesteacăn pentru valorificarea pe linie biochimică și chimică:
1 — fierbător; *2* — calorizator; *3* — evaporator; *4* — invertor; *5* — coloană de tratare cu abur; *6* — decantor; *7* — colector de şlam; *8* — colector de furfurol; *9* — schimbătoare de căldură.

Figura 106 redă schema tehnologică de pregătire a prehidrolizatului din lemn de mesteacăn pentru valorificare pe linie biochimică și chimică. Se estimează că aplicarea acestei scheme tehnologice va permite obținerea pe lîngă drojdie furajere, și a 15—15,2 kg furfuriol pe tonă de celuloză.

3.8. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A DROJDIILOR FURAJERE CULTIVATE PE LEȘIILE SULFITICE REZIDUALE ȘI PE PREHIDROLIZATE

Compoziția chimică a drojdiilor furajere variază sensibil cu vîrsta culturilor, cu stadiul lor de dezvoltare și cu felul culturilor (pure sau mixte).

Substanța uscată din drojdie este formată din substanțe organice și anorganice, cantitatea acestora și raportul în care se află variind cu specia, vîrsta, temperatura de dezvoltare și mai ales cu natura mediului nutritiv.

Peste 50% din substanța uscată a drojdiilor este constituită din compuși cu azot, dintre care 80% sînt aminoacizi, 12% acizi nucleici și 8% azot amoniacal. Circa 7% din azotul total îl reprezintă aminoacizii liberi.

Drojdiile furajere (cu un conținut de 55% proteine) au o compoziție elementară formată din 46% carbon, 30% oxigen, 6,9% hidrogen, 8—9% azot,

3.8.1. COMPOZIȚIA ORGANICĂ

Compoziția organică a drojdiilor furajere constă în principal din proteine, lipide, polizaharide și vitamine.

Conținutul de proteine variază funcție de starea fiziologică a celulei, de condițiile de mediu și de concentrația substanțelor nutritive din mediul de multiplicare (Stanciu, 1983).

În tabelul 54 este prezentat conținutul de azot și de proteine din drojdiile furajere multiplicate pe leșiile sulfitaice reziduale și pe prehidrolizat.

Conținutul de proteine din diverse specii de drojdie multiplicate pe leșiile sulfitice reziduale și pe prehidrolizat

Specia de drojdie	Mediul de multiplicare	Conținut de azot, %	Conținut de proteine, %
Candida robusta	Leșii sulfitice reziduale	9,00	56,26
Candida arborea	Leșii sulfitice reziduale	8,58	53,66
Candida torpicalis	Leșii sulfitice reziduale	8,56	53,53
Torula utilis	Leșii sulfitice reziduale	8,03	50,19
Amestec *Candida tropicalis* + + *Candida arborea* + + *Torula utilis*	Leșii sulfitice reziduale Leșii sulfitice reziduale	8,68	54,25
Candida robusta	Prehidrolizat din lemn de fag	7,62	48,00
Candida arborea	Prehidrolizat din lemn de fag	7,55	47,22
Amestec *Candida robusta* + + *Candida arborea*	Prehidrolizat din lemn de fag	7,57	47,37
Candida scottii	Prehidrolizat din lemn de fag	8,48	53,00

În vederea stabilirii valorii biologice a proteinelor s-a determinat compoziția în aminoacizi a drojdiilor furajere multiplicate pe leșiile sulfitice reziduale și pe prehidrolizatul din fag (tabelul 55) (Rozmarin, 1973, 1983, Stanciu, 1983, 1984).

Din analiza datelor prezentate, rezultă marea varietate a aminoacizilor din compoziția proteinelor și faptul că drojdiile multiplicate pe prehidrolizatul din lemn de fag au o compoziție în aminoacizi asemănătoare drojdiilor multiplicate pe leșiile sulfitice reziduale.

După cum se remarcă din tabelul 55 drojdia furajeră este bogată în cei cîțiva aminoacizi indispensabili.

Lipidele din drojdiile furajere sînt alcătuite din trigliceride, glicerofosfatide și sterine. Alături de acizii grași saturați C_{14} (acid miristic), C_{16} (acid palmitic) și C_{18} (acid stearic), sînt evidențiați acizii nesaturați $C_{16}-C_{18}$ (a căror natură nu a fost precizată).

În drojdiile furajere multiplicate pe prehidrolizat din lemn de fag, s-a determinat un conținut de grăsimi brute de 0,64%, care este superior celui din drojdiile cultivate pe leșiile sulfitice reziduale și inferior procentului de 1,1—1,4% cît este la drojdiile obținute pe melasă.

Polizaharidele evidențiate în drojdii prin conținutul de substanțe ușor și greu hidrolizabile, celuloză, au un rol pur structural, participînd la formarea structurii peretelui celular (tabelul 56). Drojdiile furajere multiplicate pe prehidrolizat din lemn de fag se caracterizează printr-un conținut mai redus de celuloză.

Glicogenul este prezent în drojdiile furajere în proporție de 32—38%. Glicogenul nu reprezintă numai o rezervă nutritivă, ci este legat și de metabolismul celular, fiind mai evident la celulele în creștere.

Vitaminele sînt prezente în cantități importante, în special cele din grupa B (B_1-B_{12}), provitamina D (ergosterolul) și carotinoidele înrudite cu vitamina A.

Aminoacidul	Mediul de cultură						
	Leșii sulfitice reziduale						Prehirolizat din lemn de fag
	Candida robusta	*Candida arboreea*	*Candida tropicalis*	*Torula utilis*	Amestec *C. tropicalis* *C. arboreea* *T. utilis*	Drojdie *Pekilo*	Amestec *Candida tropicalis* + *Candida robusta*
Acid cisteinic	4,17	3,35	4,90	0,73	5,41	1,00	—
Lizină	7,14	8,53	6,40	7,50	7,25	6,50	36,8
Asparagină	12,33	5,44	3,81	3,30	—	8,50	—
Histidină	7,33	—	—	—	—	2,00	7,2
Arginină	—	10,24	5,78	4,57	6,13	6,50	29,3
Acid glutamic	—	—	13,60	8,97	12,86	10,70	—
Serină+glicol	20,85	11,55	9,81	5,50	7,85	4,20	—
Treonină	12,74	—	8,44	8,79	7,85	4,80	20,4
Alanină	—	18,80	—	8,24	9,08	6,0	—
X_1	—	—	—	13,73	—	—	—
Prolină	Urme	2,92	1,35	1,46	4,90	3,60	—
Tirozină	—	—	7,90	1,46	—	4,00	—
Triptofan	11,25	13,44	12,25	2,20	—	1,50	4,2
Colamin	2,44	4,16	2,45	—	Urme	—	—
Valină	6,40	6,96	6,81	8,77	9,08	5,00	17,2
Metionină	Urme	—	—	—	—	1,60	7,1
Fe-alanină	3,79	3,04	6,25	7,50	9,08	4,20	18,6
Leucină + izoleucină	11,54	12,36	13,05	17,03	17,67	11,70	39,6

Tabelul 56

Variația compoziției în polizaharide, cu varietatea drojdiilor cultivate

Specia de drojdie	Extract cu			Cenușă, %	Substanțe ușor hidrolizabile, %	Substanțe greu hidrolizabile, %	Celuloză, %	Mediul de cultură
	Apă caldă	NaOH 1%	CH_3OH					
Candida robusta	37,27	31,44	13,38	9,59	1,20	4,80	8,16	Leșii sulfitice
Candida arboreea	38,09	31,30	16,34	9,40	1,35	4,74	9,00	
Candida utilis	36,50	79,40	16,19	9,10	1,58	4,53	8,09	
Amestec *Candida tropicalis* + + *Candida arboreea* + + *Candida utilis*	41,82	83,60	13,33	8,40	1,80	4,84	9,67	
Amestec de drojdii *Candida*	—	—	—	7,94	—	—	3,93	Prehidrolizât din lemn de fag

Vitaminele hidrosolubile se găsesc parțial în stare liberă și de aceea difuzează ușor acumulîndu-se în mediu.

Conținutul de vitamine este independent de condițiile de cultivare a drojdiilor, dar depinde de specia respectivă.

Tabelul 57 prezintă conținutul de vitamine (în mg/100 g drojdie) la o drojdie furajeră multiplicată pe o leșie bisulfit de calciu din lemn de eucalipt (Huber, 1966) și la o drojdie furajeră multiplicată pe prehidrolizat din paie de cereale, și din lemn de fag (Kin, 1980), comparativ cu rația zilnică necesară de vitamine pentru om.

Tabelul 57

Compoziția în vitamine (la 100 g drojdie) la drojdiile furajere multiplicate pe leșiile sulfitice reziduale și pe prehidrolizatul din paie și fag

Vitamina	Mediul de cultură			Rația zilnică pentru om
	Leșie sulfit de calciu din eucalipt	Prehidrolizat din paie	Prehidrolizat din fag	
Tiamina (B_1)	0,625	1,0	36,0	2,0
Riboflavina (B_2)	4,30	6,0	36,0	3,0
Piridoxina (B_6)	2,20	—	—	2,0
Acidul nicotinic	78,00	50,0	650,0	15,0
Biotina (H)	0,071	—	—	—
Acidul pantotenic	11,50	—	—	3,0
Acidul folic	2,5	—	—	—
Ergosterina (provitamina D)	0,36	urme	2 500	—

Drojdiile furajere apar astfel ca o sursă potențială de vitamine pentru alimentația animalelor și umană.

3.8.2. COMPOZIȚIA ANORGANICĂ

Anumite puncte de pornire și de reper cu privire la importanța substanțelor minerale, în ceea ce privește dezvoltarea drojdiilor, rezultă fără îndoială din compoziția cenușii acestora.

Conținutul de substanțe minerale al drojdiilor variază cu specia și în special cu compoziția mediului de cultură, între 2,5 și 11,5% din substanța uscată. Substanțele minerale care alcătuiesc cenușa drojdiilor sînt aproape aceleași ca-și la plantele superioare. Experiența arată că cenușa este o funcție directă de fosforul introdus în substrat pentru reacția de fosforilare.

Ca elemente dominante, fosforul și potasiul formează 60—65% din totalul cenușii.

Compoziția medie a cenușii drojdiilor comparativ cu drojdia de panificație este dată în tabelul 58.

Compoziția medie a cenușii drojdiilor (în %)

Substanța	Drojdie furajeră		Drojdie de panificație
	Limită de variație	Media	Limită de variație
P_2O_5	35—65	50	44,8—59,0
K_2O_5	26—40	31	28,0—48,0
MgO	3—7,3	6	4,0—8,1
CaO	0,4—11,3	5	1,0—4,5
Na_2O	0,8—2,3	2	0,5—2,5
SiO_2	0,3—1,8	1	0,0—1,6
Fe_2O_3	0,02—0,7	0,2	0,2—15,6
SO	0,09—0,74	0,5	0,6—7,2
Cl^-	0,1—0,65	0,3	0,03—1,0

Pentru prima dată în țară, un studiu complex privind compoziția drojdiilor furajere cultivate pe diverse substraturi a fost elaborat de Rozmarin și Stanciu (1983).

În tabelul 59 se prezintă conținutul în cenușă și compoziția în macro- și microelemente dintr-o serie de drojdii furajere multiplicate pe diverse substraturi. Din acest tabel rezultă că drojdiile furajere multiplicate pe prehidrolizat din lemn de fag au o compoziție în macroelemente asemănătoare cu drojdiile furajere multiplicate pe leșiile sulfitice reziduale, dar sînt mai bogate în fier și magneziu și mai sărace în mangan.

În general, se poate afirma că drojdiile furajere cultivate pe hidrolizatul de lemn de fag au o compoziție în aminoacizi, macro- și microelemente, similară cu drojdiile obținute pe alte substraturi.

3.9. VALOAREA NUTRITIVĂ A DROJDIILOR FURAJERE

Combinarea naturală în drojdii a proteinelor valoroase și a vitaminelor din grupa B este foarte importantă pentru hrana animalelor și păsărilor. Vitaminele din grupa B sînt strîns legate de metabolismul proteinelor în organismul animalelor, fiind componente ale sistemelor de enzime, catalizatori activi necesari pentru asimilarea aminoacizilor și sinteza poteinelor. Cenușa drojdiilor conține de asemenea macro- și microelemente valoroase pentru animale și păsări: fosfor, potasiu, calciu, fier, magnetziu, sulf, mangan, cobalt etc. În ceea ce privește conținutul de fosfor, calciu, cobalt și zinc, drojdia furajeră depășește uruiala de soia (Melms, Schwenzon, 1967).

După capacitatea de hrănire, 1 kg de drojdie fufajeră conține 1,03—1,16 unități nutritive și mai ales multă proteină reală (asimilabilă), 380—480 g.

Furajarea animalelor și păsărilor cu drojdie furajeră în stare naturală nu este recomandată, aceasta folosindu-se numai ca adaos de proteine și vitamine în rațiile de alimentare.

Un număr mare de experimentări efectuate în furajarea porcilor a demonstrat că introducerea în furaj a drojdiilor, în proporție de 8—10% din greutatea uscată a rației, mărește sporul în greutatea animalelor cu 15—20% și reduce cheltuielile de furajare pe unitate de spor cu mai mult de 10%.

Conținutul în cenușă și compoziția în macro- și microelemente din diverse drojdii furajere cultivate pe diverse substraturi

Unitatea producătoare	Mediul de cultură	Cenușă, %	Compoziția cenușii									
			SiO_2, %	Fe, ppm	Ca, ppm	Mg, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Zn, ppm	Pb, ppm	Na, ppm	K, ppm
LETEA—Bacău	Leșie bisulfitică reziduală de la fabricarea celulozei din lemn de rășinoase prin procedeul bisulfit de calciu	9,35	0,453	172,68	699,4	1030,93	61,86	—	128,87	—	1185,57	231,96
CELOHART—Zărnești	Idem	7,80	0,688	139,86	110,62	699,3	52,45	13,99	48,35	—	524,48	216,78
PERGODUR Piatra-Neamț	Leșie bisulfitică reziduală de la fabricarea celulozei pergaminabile din lemn de rășinoase prin procedeul bisulfit de calciu	9,00	0,534	186,00	595,93	930,23	41,86	7,44	51,16	—	1069,77	209,3
Media		8,71	0,558	16,618	468,65	386,82	52,05	7,14	76,12	—	926,60	219,34
CELHART DONARIS Brăila	Prehidrolizat de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag	7,55	0,650	355,03	468,75	1835,0	—	20,71	118,34	—	650,89	153,18
Idem	Idem	8,92	0,650	387,85	614,30	1458,36	41,67	33,34	91,67	—	1500,00	231,33
Media		8,23	0,650	371,44	541,44	1646,63	20,83	27,02	105,00	—	1075,44	192,25
PIRNA—Germania	90% leșie bisulfitică reziduală de la fabricarea celulozei din lemn de fag prin procedeul bisulfit de amoniu + 10% borhot de la fabricarea spirtului din leșiile bisulfitice reziduale de la fabricarea celulozei din rășinoase prin procedeul bisulfit de calciu	7,84	0,280	310,0	—	—	518	50	46	—	358	6 470
Drojdie PEKILO—Finlanda	Leșie bisulfitică reziduală de la fabricarea celulozei din lemn de rășinoase prin procedeul bisulfit de calciu	6,0	—	200	3 000	1 000	115	12	110	—	1 000	10 000

Drojdiile pot înlocui 20—30% din norma de lapte de supt pentru viței, asigurînd prin aceasta sporuri zilnice de greutate de 650—750 g. La creșterea viţeilor, 1 kg de drojdie înlocuiește 4—5 l lapte și permite obținerea în plus a 320 g carne. La furajarea vacilor de lapte cu drojdii furajere, se mărește cantitatea de lapte muls și procentul de grăsime din lapte (cantitatea de lapte crește cu 3—3,5 l pe zi, iar cantitatea de grăsime cu 0,4—0,6%). Drojdiile furajere reprezintă o hrană valoroasă pentru animalele cu blană, înlocuind 30% din carnea cu care se hrănesc. Furajarea sistematică cu drojdii furajere în fermele cu animale de blană a dus la creșterea rezistenței animalelor la îmbolnăviri și la îmbunătățirea calității blănurilor.

Adaosul de 10% în rația găinilor mărește capacitatea de ouare a acestora cu 26—51% (1 kg de drojdie furajeră permite să se obțină suplimentar 2,2—2,9 kg carne de pasăre).

Drojdiile furajere s-au valorificat cel mai bine în hrana porcilor. După numeroase cercetări au fost propuse următoarele cantități de drojdie pe zi în hrana animalelor (Kretzschmar, 1967):

— 100—150 g, și 0,5—1 kg uruială pentru porci îngrășați cu cartofi;
— 200 g, pentru scroafele foarte epuizate din cauza alăptării după înțărcare;
— pînă la 250 g, pentru scroafele care alăptează;
— 100 g, pentru scroafele după înțărcare;
— 75—100 g, pentru purcei în raport cu rasa și dezvoltarea (în vîrstă de 6 luni);
— 50—75 g, pentru purcei înțărcați de 10 săptămîni.

Drojdiile Pekilo datorită conținutului de proteine și formulei favorabile în aminoacizi se utilizează în mod frecvent la hrănirea viţeilor, porcilor și găinilor, putînd înlocui total sau parțial furaje ca făina de soia, făina de pește și lapte praf (Barber, Braude, Mitchell, 1977).

Pe baza datelor de compoziție chimică a valorilor tabelare a coeficienților de digestibilitate, precum și a regresiilor de calcul din sistemul OKIT, NRC, ARC și INRA s-a stabilit valoarea nutritivă a drojdiei multiplicate pe prehidrolizatul rezultat de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag.

Din tabelul 60 se poate aprecia că valoarea nutritivă exprimată prin unități nutritive (UN = 1,19), respectiv prin energia metabolizabilă (EM = = 2 780 kcal) sau energia netă (EN = 1 677 kcal), este similară cu a celorlalte tipuri de drojdii, datele energetice nediferențiindu-se evident la această categorie furajeră. S-a stabilit că drojdia cultivată pe prehidrolizat asigură 417 g proteină digerabilă/kg. Această valoare interesează mai puțin, deoarece în alimentația porcinelor și păsărilor unde se recomandă în calculele de asigurare nutritivă, se folosește conținutul în proteină brută și în aminoacizii lizină și metionină.

Tabelul 60

Valoarea nutritivă a drojdiei cultivate pe prehidrolizatul de la fabricarea celulozei chimice din lemn de fag
(la kg)

Substanță uscată	Proteină brută digestibilă	Unitatea nutritivă	Energie brută,	Energie metabolizată, kcal	Energie netă, kcal
907	417	1,19	4 325	2 780	1 677
1 060	460	1,31	4 768	3 605	1 849

Prin încorporarea drojdiei cultivate pe prehidrolizat în proporție de 4% într-o structură de nutreț combinat, asigură la puii de carne în perioada 28–56 zile un consum mediu zilnic de 70,43 g/cap, un spor mediu de 28,75 g/zi/cap și un consum specific de 2,45 kg furaj/kg spor, date de efect bioproductiv comparabile cu cele înregistrate la un lot de referință care a consumat un furaj cu 4% drojdie cultivată pe *n*-parafină.

3.10. OBȚINEREA PROTEINELOR FURAJERE UTILIZÎND MUCEGAIURI

În afară de metoda fabricării drojdiilor furajere din leșiile reziduale bisulfitice, mai există și altă metodă de obținere a proteinelor furajere din leșiile reziduale și anume prin intermediul mucegaiurilor de tip *Oidium*, *Fusarium*, *Penicillium sau Aspergillius* (Negoiță, 1970, Szudzinska, 1968). Spre deosebire de drojdii, mucegaiurile au ciclul de vegetație mai complex. Ele pot asimila aproape toți compușii hidrocarbonați conținuți în leșii sau în hidrolizate. De asemenea, dezvoltarea mucegaiurilor este favorizată de prezența oxigenului și umidității. Metoda de fabricare a proteinelor furajere utilizînd mucegaiuri este cunoscută sub denumirea de metoda „Bioysn". Au fost selectate două specii principale de mucegaiuri denumite Biosyn I și Biosyn II. Biosyn I se dezvoltă pe leșiile reziduale diluate cu un conținut de substanțe reducătoare care nu depășește 1%, iar Biosyn II pe leșiile reziduale cu conținut în substanțe reducătoare de pînă la 2,5%. Înainte de însămînțare cu mucegai, leșiile reziduale bisulfitice sînt neutralizate cu lapte de var pînă la $pH = 4,5-5,0$, iar apoi sînt răcite, decantate și îmbogățite cu săruri nutritive (sulfat de amoniu ca sursă de azot și fosfat de amoniu ca sursă de P_2O_5). Însămînțarea cu sușă selecționată de mucegai are loc la temperatura de 32...34°C. În raport cu drojdiile, mucegaiurile consumă aceeași cantitate de azot, însă o treime mai puțin fosfor.

Din leșiile reziduale de la fabrica de celuloză sulfit din lemn de fag sînt obținute, în medie, 30 g masă proteică Biosyn pe litru de leșie. În afară de zaharurile conținute în leșii, mucegaiurile asimilează și alte substanțe organice solubile. După terminarea fermentației, masa proteică obținută este spălată cu apă și separată prin filtrare. Consumul de apă de spălare este de numai 10% în raport cu cel necesar pentru spălarea drojdiilor.

Randamentul în substanță uscată Biosyn este de aproximativ 50% față de substanțele reducătoare, iar conținutul în proteine este de 50–53%. Diferiți specialiști consideră că valoarea biologică a masei proteice Biosyn este mai mare decît a drojdiilor, întrucît conține în plus unii aminoacizi importanți, cum ar fi cistina.

În ultima perioadă s-a acordat o atenție deosebită acestei tehnologii în corelație cu creșterea ponderii fabricării celulozelor de mare randament.

În cazul acestor celuloze, leșiile sulfitice reziduale conțin proporții mai mari de oligozaharide, care nu pot fi asimilate de drojdie fără inversie prealabilă. Mucegaiurile au, în schimb, capacitatea de hidroliză enzimatică a oligozaharidelor și de asimilare sub formă de proteine. Din numărul mare de specii de mucegaiuri pentru sinteza proteinelor prezintă importanță practică speciile *Aspergillus luchnensis, Aspergillus niger S-4, Aspergillus orizae 153* și *Oidium lactis*. Cea mai eficientă specie s-a dovedit *Aspergillus luchnensis* la care randamentul de sinteză a oscilat între 50 și 70%.

S-a constatat că este utilă însămînțarea cu mucegaiul selecționat, înainte de procedeul de fabricare a drojdiilor furajere; în acest caz mucegaiul prin enzimele pe care le produce are rolul de a inverti oligozaharidele, iar randamentul drojdiilor creşte în consecinţa, cu aproximativ 20%. Proteinele obținute cu ajutorul mucegaiurilor nu sînt toxice şi constituie un furaj valoros. Cu excepţia vitaminei B_{12}, celelalte vitamine din grupa B sînt sintetizate de mucegaiuri la fel de bine ca în cazul drojdiilor.

3.11. NOI PROCESE TEHNOLOGICE DE FABRICARE A DROJDIILOR FURAJERE

În ultimul timp, pe linia fabricării drojdiilor furajere, au apărut o serie de noi procedee tehnologice, cum ar fi procedeul Pekilo, procedeul cu jet scufundat şi procedeul Aurom.

Procedeul Pekilo se utilizează pentru producerea drojdiilor furajere din mediile care conțin glucide prin fermentarea cu microciuperca *Pecilomyces Variotti* (Ingman, 1975, 1980, Romantschuk, (1978). Ca materii prime, în afara de leşiile bisulfitice reziduale, se pot utiliza şi alte surse de glucide din industria alimentară, precum şi alte substanțe decît glucidele, cum ar fi acidul acetic.

În fig. 107 se prezintă schema simplificată a procesului Pekilo iar în fig. 108 bilanțul de materiale pentru o fabrică de drojdie furajeră prin procedeul Pekilo cu o capacitate de 30 t/zi.

Fermentarea se face la temperatura de 38°C şi pH = 4,7, timp de 3—5 ore. Deoarece microciupercile au o structută fibroasă, apare evident unul din avantajele cele mai importante ale procesului Pekilo: posibilitatea de separare a microorganismelor prin filtrare şi de deshidratare prin presare mecanică.

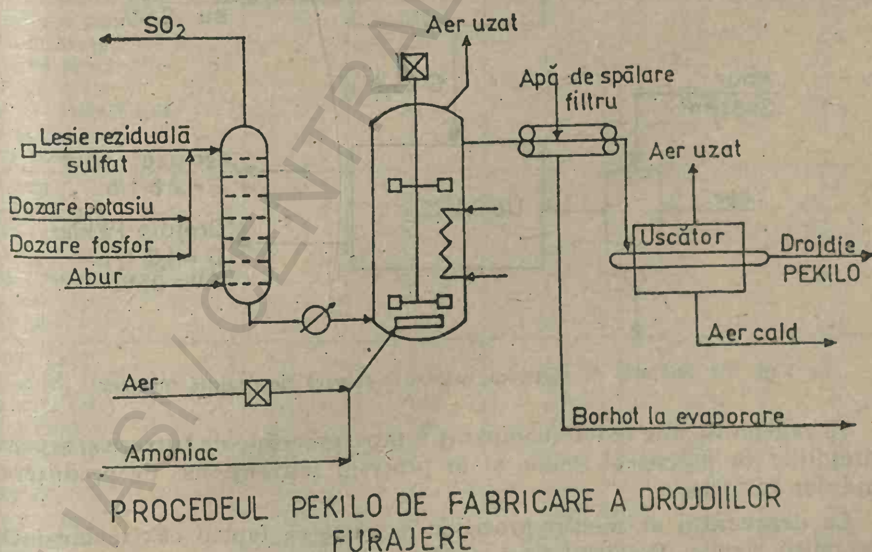


Fig. 107. Schema simplificată a procesului Pekilo.

BILANTUL DE MATERIALE PENTRU FABRICAREA DROJDIEI FURAJERE PRIN PROCEDEUL PEKILO

(Capacitate = 30 t/zi)

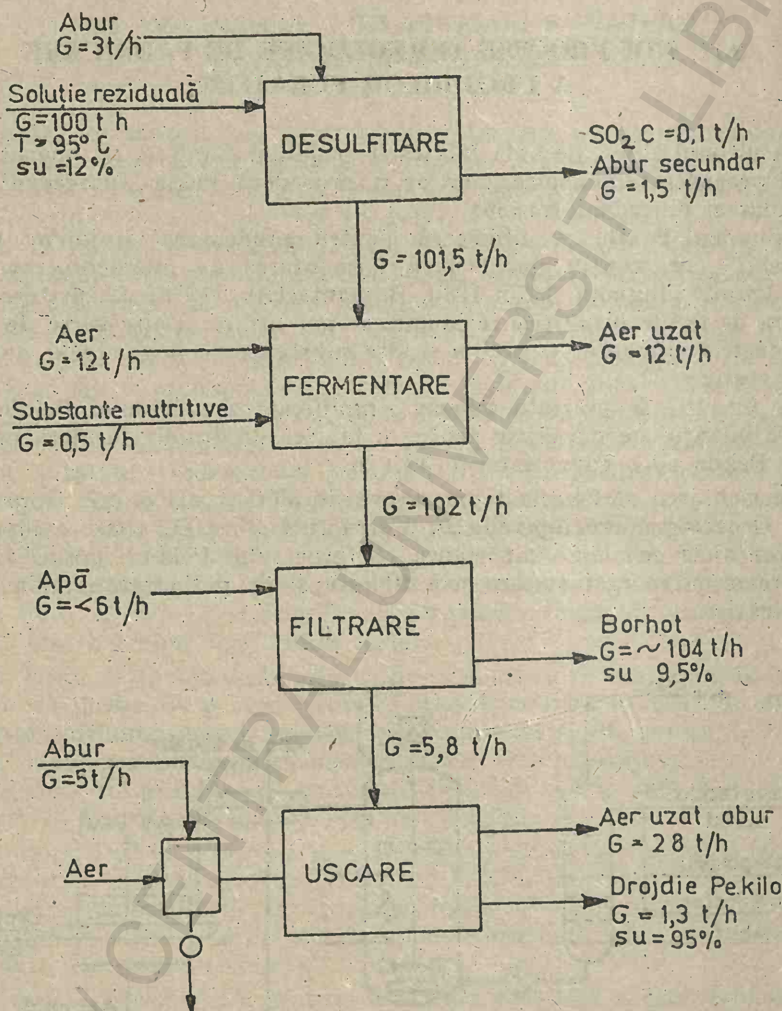


Fig. 108. Bilanțul de materiale pentru o fabrică de drojdie furajeră.

În tabelul 61 este redată comparația între procesele de filtrare și separare a drojdiilor în procedeul Pekilo și în procesul convențional de producere a drojdiilor furajere.

Ca dezavantaj al acestui procedeu se remarcă faptul că trebuie lucrat în condiții sterile. Produsul finit conține 55—60% proteină din care 85% este digestibilă.

Tabelul 61

Comparaţia între procesele de filtrare şi separare a drojdiilor furajere

Parametrii	Filtrare procedeu Pekilo	Separare drojdii
Putere instalată, kW	60—100	250—350
Apă de spălare, m³/h	6	10—15
Substanţă uscată, %	30—35	14—16
Abur la evaporare, t/h	2,8—2,3	7,6—6,5
Energie primară la uscare, GJ/h	7,0	24,7

În tabelul 62 se prezintă în mod comparativ compoziţia chimică a drojdiei *Pekilo* cu drojdia *Torula*, ICI (substrat metanol) şi B.P. *Toprima* (substrat *n*-parafine). În Finlanda, la Jamsankoski, din 1975 a fost pusă în funcţiune o instalaţie industrială cu o capacitate de 10 000 t/an.

Un alt procedeu de fabricare a drojdiei furajere este cel care utilizează **procedeul de aerare cu jet scufundar** (Chemische Technik, 1972, 1976).

Tabelul 62

Compoziţia chimică a unor tipuri de drojdii furajere

Componentul	U.M.	Pekilo	Torula	ICI	B.P. Toprina
Treonina	g/16gN	4,6	8,2	4,6	5,0
Valina		5,0	4,8	5,6	6,0
Metionina		1,6	2,3	2,5	1,6
Izoleucina		4,3	4,4	4,8	4,8
Leucina		6,8	6,2	7,6	7,0
Tirosina		3,5	3,8	3,3	4,0
Fenilalanina		4,0	3,5	3,6	4,6
Lizina		6,2	7,0	6,8	7,2
Cistina + Cisteina		1,0	—	0,7	1,3
Triptofanul		1,5	—	1,0	1,2
Umiditate, maximum	%	5,0	11,0	10,0	7,0
Grăsimi brute		1,3	0,4	8,0	2,3
Proteină brută		55	51	72	57
Celuloză brută		8	0,7	0,7	5
Azot — extract liber		25	38	7,0	24
Cenuşă		6	8	7,7	6,0
Acizi nucleici		10	10	2,2	—
Tiamină	ppm	6	10	—	4,0
Riboflavina		60	80	—	180
Piridoxină		20	20	—	25
Niacină		450	860	—	430
Acid pantotenic		40	75	—	125
Biotină		2	1	—	—
Acid folic		15	10	—	0,4
Calciu (Ca)	g/l	3	7,1	1,0	0,1
Fosfor (P)	g/l	15	22,2	24	16,0
Magneziu (Mg)	g/l	1,0	2,0	3,0	—
Sodiu (Na)	g/l	1,0	0,17	10	—
Potasiu (K)	g/l	10	16	2,0	—
Sulf (S)	g/l	5	—	10	—
Fluor (F)	mg/kg	4	—	0,043	—
Cupru (Cu)	mg/kg	12	2,2	—	—
Zinc (Zn)	mg/kg	140	450	—	—
Plumb (Pb)	mg/kg	1	1,3	—	—
Fier (Fe)	mg/kg	0,2	0,2	150	—

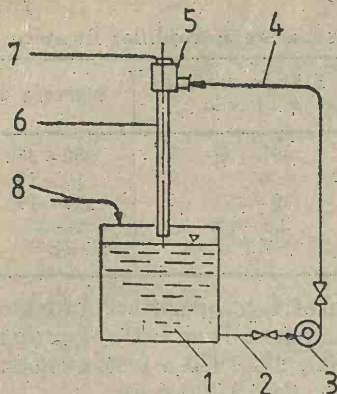


Fig. 109. Schema principială a instalației cu jet scufundat.

În fig. 109 se prezintă schema principială a instalației cu jet scufundat. Lichidul din fermentatorul *1* este aspirat prin conducta de regulare *2*, de pompa centrifugă *3*, care-l refulează prin conducta de refulare *4*, într-un deversor *5* din care, prin coloana tubulară verticală *6*, cade liber în fermentatorul *1*. La partea superioadă a deversorului *3* există un orificiu *7*, deschis sau echipat cu un filtru pentru admisia aerului în dispozitiv. Datorită construcției speciale a deversorului *5*, lichidul pătrunde în canalul superior al coloanei verticale *6* sub formă inelară. În coloana verticală lichidul își mărește progresiv viteza datorită gravitației. La capătul inferior al coloanei, respectiv la ieșirea din țeavă, viteza lichidului atinge viteza corespunzătoare căderii libere funcție de înălțimea coloanei. Ieșirea din coloană se face la nivelul suprafeței lichidului supus aerării.

Datorită influenței frecărilor lichidului de pereții coloanei verticale și turbulenței care se creează în coloană, curgerea lichidului se transformă din inelară în curgere la secțiune plină, ceea ce accelerează printr-un schimb de impuls aerul care este aspirat din atmosferă prin golire din capătul superior al deversorului. Aerul aspirat este dispersat fin în sursa de lichid, astfel încît la ieșirea din coloană este omogen.

Fabrica de drojdie Pirna-Germania dispune de o cuvă de fermentare prevăzută cu trei sisteme de aerare cu jet scufundat.

Ca materie primă fabrica Pirna utilizează un substrat constituit din circa 90% leșii bisulfitice reziduale de la fabricarea celulozei prin procedeul bisulfit de amoniu și 10% borhot rezultat de la fabricarea spirtului din leșiile reziduale bisulfit de calciu.

Parametrii de lucru ai instalației sînt:

— concentrația mustului la intrare în cuvă, 30—50 g SRT/l;

— *p*H-ul mustului la intrare în cuvă, 4,5—5,0;

— debitul de alimentare cu must al cuvei, 20—25 m^3/h;

— debitul de recirculare a mediului din cuvă, $3 \times 280 = 840$ m^3/h;

— debitul total de aer aspirat din atmosferă de cele trei dispozitive cu jet scufundat, 6 000 m^3/h;

— timpul de multiplicare, 4—5 ore;

— randamentul de consum al SRT, circa 80%;

— randamentul în drojdie furajeră raportat la SRT, 42—45%;

— consumul specific de energie electrică, 800—1 000 kWh/t drojdie.

Firma Vogelbusch — Austria a pus la punct (1980) un procedeu de valorificare complexă a leşiilor bisulfitice reziduale, care constă în utilizarea în prima treaptă a monozaharidelor şi a acidului acetic, utilizîndu-se drojdiile *Trichosporum* sau *Candida*, urmată de fermentarea borhotului lignosulfonic de o cultură mixtă formată din drojdia *Trichosporon* şi bacterii de tipul *Aerobacter*, *Pseudomonas* şi chromobacterii.

În treapta a doua de fermentare are loc utilizarea a peste 50% din conţinutul de lignină din borhot. Multiplicarea are loc la un $pH = 7-8$ şi la temperatura de 35...38°C. Randamentul în biomasă este de 25—30 kg drojdie/m³ leşie bisulfitică reziduală.

În tabelul 63 se prezintă comparativ caracteristicile leşiilor bisulfitice reziduale şi ale borhotului după multiplicare.

Eficienţa procesului de multiplicare AUROM

Tabelul 63

Caracteristici	Leşie sulfitică reziduală	
	Intrare	Ieşire
Substanţă uscată	12—15%	4—7%
Substanţe reducătoare	30—50 g/l	2—5 g/l
Acid acetic	5—10 g/l	—
CCO	120—150 g/l	40—60 g/l

Dacă în cazul procedeelor obişnuite de valorificare a leşiilor sulfitice reziduale pe drojdii furajere, are loc o reducere a CCO de numai 20—25%, în cazul acestui procedeu de valorificare în două trepte are loc reducerea CCO cu 60—70%.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANDREEV A. A., BRIZGALOV I. L. *Proizvodstvo Kormorih drojei*, Moskva, Izdatelistvo Lesnaia promişlennosti, 1965.
2. BABUŞKINA N. E., MIRONOVA K. P., OSTREVNAIA O. V. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promişlennosti, *2*, 1985, 6.
3. BARBER R. S., BRAUDE R., MITCHELL G. K. În: Animal Feed Science and Technology, *2*, 1977, 161.
4. * * * Firma BEROL A. B., Suedia. În: Raport al laboratorului de cercetări şi dezvoltări al firmei Berol referitor la aditivii contra formării de cruste în timpul prehidrolizei, 1982.
5. BRABEC J., RADEJ Z. În: Papir a Celuloza, *9*, 1967, 47.
6. CHUPKA I. E., STRAMSKII V. S., IGNATIEVA O. I. În: Ghidroliznaia i lesohimisceskaia promişlennosti, *6*, 1977, 5.
7. În: Chemische Technik, *2*, 1972, 68.
8. În: Chemische Technik, *8*, 1976, 496.
9. CIOBANU D., LUPU G., BURUIANĂ I., STANCIU C. În: *Referat privind îmbunătăţirea randamentului de transformare a zaharurilor din melasă în drojdii furajere* (nepublicat), 1975.
10. CRISTEA V. În: Celuloză şi Hîrtie, 13, 7, 1964, 215.

11. DSHAN L. S., KOSHUKHAROVA N., MIHAILOVA M. În: Tseluloza i Khartya, 3, 3, 1978, 44.
12. DUMITRU I. F. IORDĂCHESCU D. *Enzime-structură și mecanisme de acțiune*, București, Editura Medicală, 1974.
13. EGOROV B. N. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 6, 1981, 21.
14. FEDOSEVA R. A., MIRONOVA G. N. În: Khim. Pererabotka FDrevesini, Ref. Inform., 2, 1967, 6.
15. FEKOLIN N. V. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 6, 1967, 23.
16. FILIPOV L., LI SAN DJON, MONEVA L., DIMITROV D. În: Tseluloza i Khartya, 8, 1977, 6.
17. FLIATE D. M., POMBOVA A. T., În: Bumajnaia promîșlennosti, 5, 1983, 10.
18. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 5, 1971, 10.
19. HERCZECH M. În: Studierea proceselor polimerice în fazele de prelucrare a prehidrolizatului pentru reducerea fenomenului de depunere a acestora pe instalații (referat nepublicat), 1987.
20. HERCZEGH M. În: *Stabilirea condițiilor de aclimatizare a speciei de drojdie* Candida scotii *de înaltă productivitate pe soluția reziduală provenită de la fierberea celulozei prin procedeul bisulfit de sodiu* (referat nepublicat), 1991.
21. HERCZEGH M. În: Studierea proprietăților spumante ale prehidrolizatului și modalități de reducere a formării spumei în procesul de fabricare a drojdiei furajere (referat nepublicat), 1991.
22. HOJNOS J. În: Papir a Celulosa, 39, 9, 1984, 185.
23. HOLKIN I. IU. În: *Tehnologhia ghidroliznih proizvostvo*, Moskva, Lesnaia promîșlennosti, 1989.
24. HUBER O. În: Das Papier, 20, 4, 1956, 23.
25. IAGUSCH L., SCHONHERR W. În: Chemische Technik, 2, 1972, 73.
26. INGMAN M. În: *The Pekilo-process description of a development* project, OY-Tampela AB., Finlanda, 975.
27. INGMAN M. În: Wochenblatt fur Papierfabrication, 8, 1980, 193.
28. KIN Z. În: *Hemicelulosy chemia i wykorzystanie*, Waszawa, Panstwowe wydawnictwo rolnicze i lesne, 1980.
29. KOVASIN K., REILAMA I., METSARIRTA A. În: Rauma Repola Reports, 2, 1983, 32.
30. KRETZSCHMAR G., *Die Erzeugan von Futterhefe*, Novembre, 1965.
31. KRETZSCHMAR G. În: Zellstoff und Papier 10, 1967, 317.
32. LI SAN DJON. În: Tseluloza i Khartya, 2, 1972, 32.
33. MAAS-FORSTNER M. În: Arch. Microbiol., 22, 1955, 113.
34. MELMS F., SCHWENZON K., *Verwertungsgebiete für Sulfitblauge*, Leipzig, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1967.
35. MIRZOIAN A. Z., SAPOTNITKI A. S. În: Ghidroliznaia i lesohemisceskaia promîșlennosti, 4, 1972, 7.
36. MONOD J. *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*, Hermann et lie, Paris, 1942.
37. MOSCOVTEV N. G., STRELSKAIA S. A. În: Him. Drev., 1, 1986, 41.
38. OBROCEA P., GAVRILESCU D., BOBU E. În: *Tehnologia celulozei și hîrtiei, Aplicații practice*, I. P. Iași, 1987.
39. ORLOV V. I., ALEXANDROV L. A., TARASYUK D. D. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 5, 1977, 4.
40. ORLOV V. I., TARASYUK D. D. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 6, 1978, 3.
41. ORLOV V. I., JIGALOV IU V. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 1, 1987, 19.
42. PASSINEN K., SJÖSTROM E., Comunicare la Simpozionul „Chimia lemnului pură și aplicată", Los Angeles, 31.03—5.04.1974.
43. PEAAL A. În TAPPI, 65, 5, 1982, 68.
44. POLAND D. BEHRENS U., LEIBNITZ E. În: Zellstoff und Papier, 17, 1, 1968, 5.
45. PNUE — *Collection industrie et environnement, Gestion de l'environnement dans industrie de la pâte et du papier*, 1980.
46. În: Pulp Paper International, 5, 1989, 95.
47. RAITSEVA N. K. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, 11, 1961, 76.
48. ROMANTSCHUK H., LEHTOMAKI M. În: Process Biochemistry, 13, 3, 1978, 11.

49. ROZMARIN GH. *Tehnologia fabricațiilor hidrolitice și fermentative*, Curs litografiat, I. P. Iași, 1970.
50. ROZMARIN GH., GRIGORAȘ M., ASANDEI C. A., POPA M. S., STOLERU A. În: Celuloză și Hîrtie, 22, *5*, 1973, 191.
51. ROZMARIN GH., POPA V., STAFIE O., TOTH I. În: Celuloză și Hîrtie, 22, *7*, 1973, 293.
52. ROZMARIN GH., STANCIU C. În: Celuloză și Hîrtie, 27, *2*, 1978, 41.
53. ROZMARIN GH., STANCIU C., CIOBANU D., HERCZEGH M. În: Celuloză și Hîrtie, 29, *2*, 1980, 57.
54. ROZMARIN GH., STANCIU C. În: Celuloză și Hîrtie, 37, *4*, 1983, 218.
55. ROZMARIN GH. *Fundamentări macromoleculare ale chimiei lemnului*, București, Editura Tehnică, 1984.
56. ROZMARIN GH., STANCIU C. În: Celuloză și Hîrtie, 34, *1*, 1985, 5.
57. ROZMARIN GH., STANCIU C., CIOBANU D. În: Celuloză și Hîrtie, 35, *1*, 1986, 9.
58. SAHANOVA K. R. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *6*, 1979, 10.
59. SOLOVIOV N. V., RIABCINK N. G. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *5*, 1989, 1.
60. SJOSTROM E. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*, S.U.A., Academic Press, 1981.
61. SAPOTNITKI S. A. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *6*, 1979, 10,
62. STANCIU C. În: Celuloză și Hîrtie, 23, *4*, 1974, 149.
63. STANCIU C. Referat. *Legile multiplicării industriale a drojdiilor furajere*, I. P. Iași, 1975.
64. STANCIU C. În: Lucrările celui de al patrulea Simpozion de microbiologie industrială, Galați, 9—10 septembrie 1983, 479.
65. STANCIU C. Teză de doctorat, I. P. Iași, 1984.
66. STANCIU C. În: Celuloză și Hîrtie, 36, *1*, 1987, 17.
67. STANCIU C., ROZMARIN GH. În: Celuloză și Hîrtie, 38, *1*, 1989, 31.
68. STANCIU C., ROZMARIN GH., HERCZEGH M., IACOB N., Comunicare la cel de al X-lea Simpozion internațional de chimia și tehnologia celulozei, Iași 5—7 septembrie 1991.
69. STANCIU C., BĂIULESCU G. E., HERCZEGH M., MAXIM M. Comunicare la cea de a X-a Conferință Națională de Chimie Analitică, Iași, 19—20 septembrie, 1991.
70. STAVIK J. În: Papir a celulosa, 44, *2*, 1989, 256.
71. În: Svensk Papperstinding, *8*, 1975, 10.
72. SARU E. *Biochimie vegetală*, vol. II, București, Editura Medicală, 1973.
73. SCHIMDT G. În: Celluloza e Carta, 18, *10*, 1978, 13.
74. SCHMIDT G., HECHT L., TANNHAUSER. În: J. Biol. Chem., *187*, 1979, 733.
75. SARKOV I. V., KUIBINA I. I., *Himia Ghimitceliuloz*, Moskva, Izdatelistvo Lesnaia promîșlennosti, 1972.
76. ȘTEFAN G. În: Celuloză și Hîrtie, 13, *2*, 1964, 55.
77. ȘTEFAN G. În: Celuloză și Hîrtie, 13, *5—6*, 1964, 215.
78. TARASYUK D. D. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *5*,, 1978, 7.
79. TATARSKII A. I. În: Ghidroliznaia i lesohimicesaia promîșlennoksti *6*, 1970, 8.
80. TUOMINEN V. N. În: Papperi ja pun, 9, 1988, 517.
81. UNDEWOOD E. J. *Trace element in human and animal nutrition*, N.Y., Academic Press, 1977.
82. USATOVA T. V. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *5*, 1974, 25.
83. * * * *Valorificarea prin fermentare a leșiilor bisulfitice reziduale.* Traducere din limba rusă, București, I.D.T., 1957.
84. VASILESCU I. *Enzimele.* București, Editura Academiei, 1964.
85. ZVYAGIN N. I. În: Ghidroliznaia i lesohimiceskaia promîșlennosti, *8*, 1968, 17.

4. OBȚINEREA PROTEINELOR DIN DROJDII PE *N*-ALCANI

A. VAMANU, D. ARIZAN, RODICA ARIZAN, CRISTINA POPA

4.1. INTRODUCERE

Cererile crescute pentru proteine de uz furajer și pentru alimentația umană au condus în ultimele decenii la o creștere intensă pe plan mondial pentru găsirea altor surse decît cele bazate pe agricultură. O astfel de sursă este biomasa obținută prin cultivarea celulelor microbiene e *n*-alcani ca materie primă.

Botanistul japonez Miyoshi (1895) este primul care a observat că specia *Botrytis cinerea* poate ataca parafina, iar prima referință despre o drojdie utilizatoare de hidrocarburi a fost dată de Perrier în 1913.

Studii detailate asupra creșterii drojdiilor pe *n*-parafine au apărut către sfîrșitul anilor '50. Just și colab. (1948, 1951) au fost primii care au crescut *Candida tropicalis* și *Candida lipolytica* în condiții nesterile pe medii conținînd săruri anorganice și parafine ca singură sursă de carbon. O altă referință despre creșterea drojdiei *Candida tropicalis* pe parafine a fost făcută de Hoerburger (1955). Mai tîrziu, lucrări mai generale despre microbiologia petrolului au adus la zi acest subiect (McKenna și Kallio, 1965; Einsele și Fiechter, 1971; Klug și Markovetz, 1971; Shennan și Champagnat, 1974; Levi, 1974; Litchfield, 1977; Levi și colab., 1979; Rehm și Reiff, 1981; Fukui și Tanaka, 1980, 1981; Einsele, 1983).

Cercetări sistematice, efectuate prin utilizarea unor hidrocarburi cu structuri diverse, au dus la concluzia că întrebuințarea parafinelor normale în amestec cu alte clase de hidrocarburi creează dificultăți tehnologice în procesul de fermentație, precum și în etapa de purificare a concentratelor proteice care rezultă. În același timp, valoarea nutritivă a biomaselor rezultate este mai redusă.

Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul utilizării *n*-parafinelor pure sau a fracțiunilor de *n*-parafine lichide ($C_{10}-C_{20}$), înregistrîndu-se randamente în biomasă de pînă la 100% față de hidrocarburile consumate. Proporțiile de *n*-parafine variază între 0 și 30%, în funcție de originea țițeiului. În ge-

neral, multe zăcăminte africane par să fie bogate în n-parafine, cele din Orientul Mijlociu par să conţină mai puţine, în timp ce zăcămintele din Marea Nordului sînt deseori sărace în n-parafine.

Conţinutul de parafine superioare din ţiţeiul prelucrat în Europa de Vest în fiecare an este estimat la 10%, procent ce asigură un potenţial de materie primă pentru producerea de biomasă de peste 50 milioane t/an (Levi şi colab., 1979).

Principalele capacităţi producătoare de biomasă din n-parafine sînt prezentate în tabelul 64, din care rezultă că se foloseşte atît procedeul de obţinere a biomasei din n-parafine cît şi cel cu motorină, pe care se cultivă de preferinţă drojdiile.

Tabelul 64

Capacităţi de producere a biomasei microbiene din n-parafine
(Moo-Young, 1976 ; Dimmling şi Sambeth, 1981)

Compania	Localitatea	Cantitatea t/an	Microorganismul de substrat
British Petroleum	Grangemouth, Scoţia	4 000	Drojdii-Parafine
	Marea Britanie	100 000	Drojdii-Parafine
	Lavera Franţa	16 000	Drojdii-Motorină
British Petroleum + + Italprotein S.p.a.	Sardinia	100 000	Drojdii-Parafine
Liquichemica Biosintesi S.p.a.	Reggio Calabria	100 000	Drojdii-Parafine
Roniprot	Curtea de Argeş, România	60 000	Drojdii-Parafine
Hoechst/Uhdle	Frankfurt, R.F.G.	Pilot	Drojdii-Parafine

În proiectarea proceselor de obţinere a proteinelor din n-parafine şi motorină apar aceleaşi probleme dificile care se cer soluţionate cît mai economic. Principalele aspecte care determină fezabilitatea acestor tehnologii sînt :

— asigurarea unor cantităţi suficiente de energie care să permită o dispersie foarte fină a hidrocarburilor nutritive în faza apoasă, astfel încît transferul de masă de hidrocarburi către celule să nu devină treapta determinantă de viteză ;

— asigurarea cantităţii de oxigen necesară creşterii, simultan cu asigurarea posibilităţilor de eliminare din biomasă a căldurii de reacţie (suficient de mare) la aproximativ 30...35°C ;

— stabilirea productivităţii proceselor de fermentaţie continuă pentru care consumul de energie să fie minim şi beneficiul maxim ;

— folosirea unor surse de materii prime ieftine şi care să asigure randamente mari în biosinteză ;

— folosirea unor microorganisme capabile să utilizeze cît mai eficient substratul.

4.2. OBȚINEREA N-PARAFINELOR DIN PETROL

În petrol se găsesc toate seriile de hidrocarburi printre care și alcanii, care sînt hidrocarburi saturate, în general neciclice. Ei se subdivid în alcani lineari și alcani ramificați.

Alcanii cu catenă lineară numiți *n*-parafine sînt prezenți în toate fracțiile petroliere, de la cele mai volatile pînă la cele mai grele. Ei sînt în stare gazoasă la presiunea atmosferică, de la metan (methane) pînă la pentan (penthane) — hidrocarbură cu 5 atomi de carbon.

Alcanii lineari de la C_6 la C_{16} sînt lichizi la temperatura de 20°C. Într-un mediu de 30°C frecvent utilizat în fermentație, faza lichidă ajunge pînă la C_{18} (punct de topire 28°C). Deși nu sînt lichizi, omologii superiori lui C_{18} pot fi prezenți în fracțiile de *n*-alcani din motorină, pentru că ei pot fi dizolvați în *n*-alcani inferiori.

Alcanii liniari de la C_{22} la C_{50} sînt constituenți esențiali din parafinele comerciale.

Omologii inferiori din seria parafinelor, care sînt lichizi la temperatura camerei (*n*-pentan, *n*-hexan, *n*-heptan și *n*-octan), nu sînt de obicei utilizați de microorganisme în procesul de creștere. Se pare că aceasta se datorează proprietății lor de a dizolva membranele celulare sau structurile proteice care înconjoară membrana, în special cele care asigură transportul și oxidarea acestor substraturi (Einsele, 1983). Aceste constatări au exclus folosirea *n*-alcanilor cu catenă scurtă ca substrat nutritiv pentru procesele microbiene.

n-Alcanii lichizi saturați puri nu sînt produși la scară comercială, însă amestecurile sînt disponibile comercial, în cantități mari, de exemplu, în motorină (combustibil diesel), care conține 10—30% parafine și în cîteva "fracții" de *n*-alcani purificați extrași din kerosen (C_{10}—C_{30}) (tabelul 65).

Tabelul 65

Distribuția fracțiilor de n-parafine
(Procente de masă, după Levi și colab., 1979)

Alcanul	Fracțiunea petrol lampant	Fracțiunea motorină	Fracțiunea ceară brută
n-C_{10}	6	—	urme
n-C_{11}	39	urme	urme
n-C_{12}	42	urme	1
n-C_{13}	13	4	2
n-C_{14}	urme	28	3
n-C_{15}	—	29	5
n-C_{16}	—	22	8
n-C_{17}	—	12	14
n-C_{18}	—	4	21
n-C_{19}	—	1	19
n-C_{20}	—	—	13
n-C_{21}	—	—	9
n-C_{22}	—	—	4
n-C_{23}	—	—	1
n-C_{24}	—	—	urme

Din punct de vedere al materiei prime, cele mai simple procese ce utilizează hidrocarburi lichide ca substrat sînt cele care se bazează pe fracțiunile neprelucrate din petrol, cum sînt motorina și petrolul lampant. Pentru a obține aceste substraturi din petrol brut este necesară o simplă distilare. Dezavantajul constă în faptul că nu este posibil să se opereze cu o astfel de alimentare care să asigure consumul întregii cantități de *n*-parafine din fracția utilizată (și deci nu este economic). În plus, efluentul din fermentator conține 70—90% hidrocarburi nemetabolizate.

De aceea este necesar un sistem complicat de separare a drojdiei din biomasă cu ajutorul unor centrifuge speciale (Hodge, 1970).

Utilizînd *n*-parafine de o puritate mai mare de 95%, obținute prin procedeul adsorbției selective pe site moleculare, se poate conduce bioprocesul astfel încît să se consume aproape 100% parafină adăugată ; se obține astfel 1 kg biomasă și 1,6 kg CO_2 și produși secundari din 1 kg *n*-parafină consumată. În acest mod conținutul în *n*-parafină reziduală în efluent este redus la maximum, obținîndu-se un produs acceptabil în întregime prin simplă concentrare și uscare.

n-Parafinele conținînd între 10 și 20 atomi de C sînt sursele de carbon cele mai potrivite pentru drojdii. Deși amestecurile de *n*-parafine pure sînt substraturile preferate pentru creșterea microorganismelor, datorită costurilor scăzute și simplității proceselor de biosinteză și alte produse petroliere conținînd un anumit procent de *n*-parafine (motorina) pot fi utilizate pentru obținerea de biomasă proteică.

4.3. MICROORGANISME CE CRESC PE HIDROCARBURI

Numeroși autori au publicat liste de microorganisme capabile să crească pe hidrocarburi.

Quayle (1967), făcînd un rezumat al acestor publicații, a estimat că un sfert din microorganismele reunite în colecțiile reprezentative, fără nici o preferință de selectivitate, sînt capabile să utilizeze hidrocarburi. De atunci, frecvența referințelor despre bacterii, drojdii, fungi care asimilează cu ușurință hidrocarburi a crescut (Sherman și Levi, 1974 ; Levi și colab., 1979 ; Rehm și Reiff, 1981).

Microorganismele consumatoare de *n*-alcani lichizi pot crește pe surse de carbon oxidate. În general, rata lor de creștere pe glucoză este mult mai mare decît cea pe parafine.

Drojdii consumatoare de *n*-parafine. Drojdiile capabile să crească pe hidrocarburi sînt obținute din medii naturale, prin culturi îmbogățite sau sînt procurate din colecțiile existente în numeroase țări. O cultură îmbogățită constă în însămînțarea unui inocul dintr-un mediu natural, într-un mediu nutritiv unde hidrocarbura constituie singura sursă de carbon și energie. După cîteva repicări în acest mediu selectiv, microorganismele capabile să utilizeze hidrocarbura se dezvoltă în colonii majoritare, permițînd astfel izolarea lui în cultură pură.

Culturile îmbogățite permit găsirea în mediile naturale a numeroase varietăți de microorganisme apte să se dezvolte pe hidrocarburi.

Cele mai multe date din literatură se referă la speciile genului *Candida* precum și la alte drojdii asporogene cum sînt *Rhodotorula, Torulopsis* și *Trichosporon.*

Levi și colab. (1979) au menționat că genul *Candida* cuprinde un număr mare de specii diverse "nenaturale", multe din ele fiind reclasificate în general sporogen. În consecință, una dintre cele mai familiare specii care utilizează hidrocarburi, *Candida lipolytica*, a fost reclasificată ca *Saccharomycopsis lipolytica.* Shennan și Levi (1974) au descris 40—50 specii ale genului *Candida* care pot asimila hidrocarburi. Dintre acestea, cele mai cunoscute sînt *C. guilliermondii, C. intermedia, C. maltosa, C. parapsilopsis, C. rugosa* și *C. tropicalis.*

Din grupul sporogen, genurile *Pichia* și *Debaryomyces* conțin multe specii asimilatoare de hidrocarburi. Folosind clasificarea curentă a drojdiilor făcută de Lodder (1970) și ultimele amendamente, Bos și De Bruyn (1973) arată că genurile perfecte *Saccharomyces, Kluyveromyces* și *Hansenula*, dar nu și *Saccharomycopsis*, sînt complet lipsite de proprietatea de a asimila hidrocarburi.

Experimente taxonomice și genetice efectuate pe culturi de *Saccharomyces cerevisiae* care asimilează hidrocarburi au demonstrat că acestea sînt tulpinile de *Candida maltosa.*

Principalele genuri de drojdii a căror specii sau tulpini pot asimila hidrocarburi sînt prezentate în tabelul 66.

Tabelul 66

Genuri de drojdii care conțin specii și tulpini asimilatoare de hidrocarburi
(Levi și colab., 1979)

Ascomycetes	*Debaryomyces*	Fungi imperfecți	*Candida*
	Endomyces		*Rhodotorula*
	Lodderomyces		*Selenotila*
	Metschnikowia		*Sporidiobolus*
	Pichia		*Sporobolomyces*
	Saccharomycopsis		*Torulopsis*
	Schwanniomyces		*Trichosporon*
	Wingea		
Bazidiomycetes	*Leucosporidium*		
	Rhodosporidium		

Interes practic prezintă acele tulpini de drojdii care sînt capabile de a metaboliza substraturile carbonate (hidrocarburi sau derivați) în proteine, cu randamente de interes industrial și care să prezinte următoarele caracteristici : viteze mari de creștere, mediu nutritiv ieftin, conținut ridicat în aminoacizi esențiali, valoare biologică mare, absența totală a toxicității, producție stabilă.

Conținutul celular în proteină este direct legat de viteza de sinteză a proteinei, deci de viteza de creștere a microorganismelor, deoarece valoarea procesului obținut este direct proporțională cu cantitatea de proteină brută produsă. Aceasta înseamnă că pentru a mări conținutul proteic sînt necesare viteze specifice de creștere mari.

Tehnica cultivării continue este o metodă rapidă și eficientă pentru a selecta proprietăți speciale ale levurilor care cresc pe *n*-alcani.

Descoperirea sexualității la *Saccharomycopsis lipolytica* de către Wincherman și colab. (1970) a creat posibilitatea hibridării la aceste specii,

al căror potențial viitor pare să fie enorm, prin producerea de celule diploide care au un volum mai mare decît cele haploide și în consecință un conținut proteic în biomasă mai mare.

Cercetările actuale din domeniul ingineriei genetice includ fuziunea de protoplaste care oferă posibilitatea hibridării intra- și interspecifice și intergenerice și astfel transferul unor elemente celulare de la alte organisme (cromozomi, alte organite celulare, gene, plasmide; Williams, 1978).

4.4. METABOLISMUL N-ALCANILOR. GENERALITĂȚI

Z o b e l l (1946) a formulat 4 reguli pentru specificitatea utilizării hidrocarburilor de către drojdii. Aceste reguli au fost revizuite de S h e n n a n și L e v i (1974).

a) **Compușii alifatici sînt mult mai ușor atacați decît compușii aromatici.** Aceștia din urmă sînt prezenți ca impurități în sursa de hidrocarburi și se consideră că sînt toxici pentru drojdii. Un conținut mare de compuși aromatici poate da un gust și un miros neplăcut biomasei, putînd fi o sursă potențială pentru producerea de substanțe cancerigene.

Hidrocarburile alifatice sînt asimilate de tulpini de drojdii ce aparțin diverselor specii și genuri. Alte clase de compuși, inclusiv hidrocarburile aromatice, pot fi oxidate, dar de obicei nu sînt asimilate eficient.

b) **Catenele lungi sînt descompuse preferențial față de cele scurte.** S h e n n a n și L e v i (1974) au tras concluzia că specificitatea de substrat în ceea ce privește lungimea catanei este în funcție de specie sau tulpina de drojdie testată. Cele mai multe cercetări au inclus *n*-alcani cu o lungime a catenei între $C_{10}—C_{18}$. În literatura de specialitate sînt citate specii de drojdii care pot utiliza catene mai mari decît C_{18}, dar pentru că acestea sînt solide la temperatura normală de creștere, trebuie de obicei solubilizate înainte de folosire într-un transportor inert, cum este de exemplu pristanul (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecan).

De aceea sînt preferați compușii cu o lungime medie a catenei de carbon.

n-Alcanul cu cea mai scurtă catenă care poate fi folosit pentru creșterea drojdiilor este *n*-nonanul. *n*-Alcanii cu o catenă mai scurtă decît *n*-nonanul nu sînt de obicei asimilați de către drojdii, dar pot fi oxidați. Randamentul de transformare crește, dar viteza de oxidare scade pentru catene mai lungi decît n-nonan.

c) **Compușii nesaturați sînt degradați mult mai ușor decît cei saturați.** S-au găsit multe drojdii care utilizează 1-alchene ca substrat de creștere, dar randamentul de transformare este de obicei mult mai scăzut decît cel obținut la *n*-alcanul corespunzător.

d) ***n*-Alcanii cu catenă ramificată sînt degradați mult mai ușor decît moleculele neramificate.** Această regulă nu este în întregime valabilă pentru drojdiile care în general asimilează hidrocarburi, pentru că alcanii cu catenă ramificată sînt atacați numai dacă există în structura lor o porțiune de catenă liniară destul de lungă. S h e n n a n și L e v i (1974) consideră că, compușii cu catenă modificată sînt degradați mai greu decît compușii cu catenă lineară, regula a doua putîndu-se aplica la o porțiune de catenă lineară din alcanii ramificați.

4.4.1. OXIDAREA INIȚIALĂ A MOLECULEI DE ALCAN

Din studiile efectuate cu privire la oxidarea inițială a moleculei de alcan s-a tras concluzia că prima reacție este catalizată de o oxigenază, pentru că primul pas este încorporarea oxigenului molecular în molecula de alcan.

Levi și colab., 1979) au format 3 mecanisme pentru această reacție inițială :

— o oxidare care implică un cytocrom notat P-450 sau rubredoxin;

— o hidroperoxidare ;

— o dehidrogenare fără a include oxigenul.

Pe de altă parte, Rehm și Reiff (1981) descriu 4 mecanisme făcînd o distincție clară între oxidarea care implică cytocromul P-450 și oxidarea cu un sistem oxidativ cu funcție mixtă, dar care nu cuprinde P-450.

4.4.2. SISTEMUL DE OXIDARE CU FUNCȚIE MIXTĂ FĂRĂ IMPLICAREA CYTOCROMULUI P-450

Acest sistem s-a găsit în extractele celulare ale microorganismelor care asimilează *n*-alcani și este format din 3 componente : rubredoxina, o reductază dependentă de NADH și o alcan-1-hidroxilază (fig. 110).

Aceste extracte sînt capabile să oxideze diferiți alcani, alchilbenzeni și alchilcicloalcani. Alcanii cu catenă lineară sînt mult mai ușor oxidați decît cei ramificați. Pe baza acestei constatări se apreciază că numai aceste molecule cu configurație plană vor putea ajunge la centrul activ al hidroxilazei.

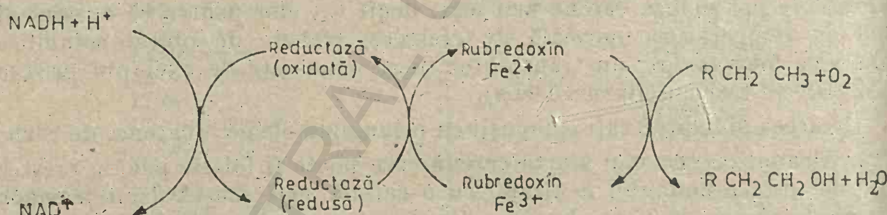


Fig. 110. Sistemul de oxidare al alcanilor cu funcție mixtă fără cytocrom P-450 (Rehm și Reiff, 1981).

4.4.3. SISTEMUL DE OXIDARE CU FUNCȚIE MIXTĂ, INCLUZÎND CYTOCROMUL P-450

Datele din literatura de specialitate arată că formarea lui P-450 în specia de drojdie *Candida tropicalis* este indusă de alcani cu o catenă mai lungă, alcooli secundari și cetone, iar sistemul de hidroxilază al citocromului P-450 este dependent de NADPH$+$H$^+$ (fig. 111) (Duppel și colab., 1973).

Hexadecanul, ca sursă de carbon, depresează enzimele care oxidează alcanii din celulele de *C. tropicalis* crescute pe substrat de glucoză, negăsindu-se nici un efect al activității specifice a alcool și aldehid-dehidrogenazei (Gmunder, 1979).

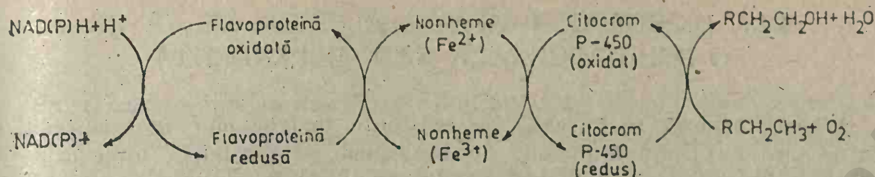


Fig. 111. Sistemul de oxidare cu funcţie mixtă al alcanilor cu cytocrom P-450 (Duppel şi colab., 1973).

Cercetările au evidenţiat faptul că o dată cu creşterea concentraţiei de P-450, creşte şi concentraţia de NADPH-citocrom microsomal al C-reductazei. Concentraţia de citocrom P-150 creşte liniar cu viteza specifică de consum a hexadecanului, în special atunci cînd în cultivarea continuă alimentarea cu oxigen este limitată.

Deci citocromul P-450 pare să fie implicat în treapta care limitează viteza de consum şi de oxidare a alcanilor. G m ü n d e r (1979) sugerează că citocromul P-450 care este localizat în microsomi catalizează hidroxilarea monoterminală a hexadecanului în reticulul endoplasmic al *C. tropicalis*.

4.4.4. FORMAREA DE HIDROPEROXIZI PRIN INTERMEDIARI CU RADICALI LIBERI ŞI REDUCEREA LA ALCOOLI PRIMARI ŞI SECUNDARI

În acest caz, alchilhidroperoxizii se formează printr-un mecanism cu radicali liberi în timpul oxidării microbiene a *n*-alcanilor. În faza următoare are loc reducerea de alcooli şi oxidarea la cetone (fig. 112).

În literatura de specialitate există totuşi puţine referiri care să sprijine acest mecanism de formare a intermediarilor hidroperoxizi în oxidarea *n*-alcanilor.

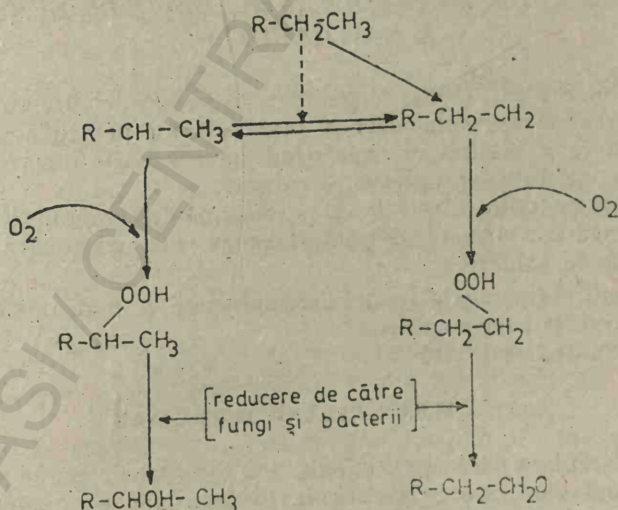


Fig. 112. Formarea hidroperoxizilor prin intermediari cu radicali liberi (Rehm şi Reiff, 1981).

4.4.5. DEHIDROGENAREA LA ALCHENE DE CĂTRE O DEHIDROGENAZĂ NAD^+-DEPENDENTĂ

Această schemă se bazează pe existența 1-alchenelor în amestecul de reacție care cuprinde *n*-alcanii, de asemenea pe existența unui inhibitor al NAD^+-oxidazei (mercaptoetanol) și a unui sistem enzimatic care reduce NAD^+.

În acest mecanism se va forma întîi o alchenă care va reacționa la alcool pe două căi : prin formarea unui epoxid sau prin adiția apei (fig. 113).

R o t l e d g e (1978) nu este de acord cu formarea 1-alchenelor ca intermediari liberi în oxidarea alcanilor deoarece prezența unei trepte de dehidrogenare a alcanului, legată de NAD^+, este greu de susținut pe baze termodinamice.

Rezultatele cercetărilor experimentale par a favoriza mecanismele care implică fie citocromul P-450 fie rubredoxina în reacție de oxidare primară din cadrul procesului de degradare microbiană a hidrocarburilor.

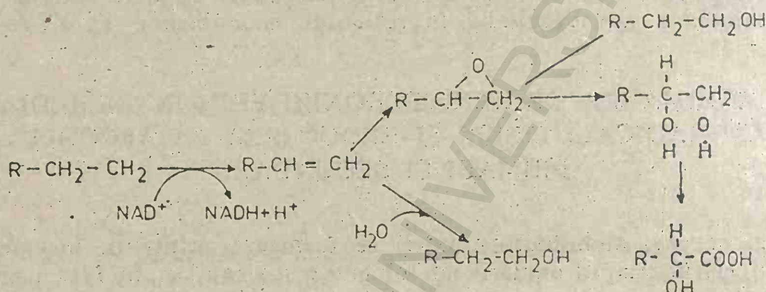


Fig. 113. Dehidrogenarea alcanilor la alchene și reacțiile următoare (Rehm și Reiff, 1981).

4.4.6. CĂILE METABOLICE DE DESCOMPUNERE A N-ALCANILOR

R e h m și R e i f f (1981) au studiat un sistem de corelații care există între clasificarea microorganismelor și preferința lor pentru o anumită cale de descompunere a *n*-alcanilor, analizînd intermediarii formați în timpul creșterii microorganismelor pe acest substrat.

Unul dintre criteriile de clasificare a căilor de descompunere este izolarea acestor intermediari, urmată de determinarea enzimelor care catalizează fiecare treaptă de oxidare

Există două căi principale de descompunere a *n*-alcanilor :

— calea oxidării terminale ;

— calea oxidării subterminale ;

4.4.6.1. CALEA OXIDĂRII TERMINALE

În mecanismul de oxidare terminală una sau ambele grupe sînt oxidate, astfel că această cale este împărțită în oxidare monoterminală și oxidare diterminală.

Această cale are ca rezultat formarea acizilor grași corespunzători.

Există multe date în literatura de specialitate (Klug și Markovetz, 1971, insele și Fiechter, 1971, Rehm și Reiff, 1981, Einsele, 1983) care confirmă, in indici biochimici, existența căii de degradare monoterminală prin canoli, alcanolizi și acizi alcanoici.

Acizii grași, corespunzători formați din alcani, pot fi oxidați prin β-oxidare, tfel încît sînt produse unități $-C_2$ în cantități mari. Toate microorganisele care cresc pe hidrocarburi alifatice, ca singură sursă de carbon, încorporează în lipidele celulare un număr mare de acizi grași, rezultați ca intermedi-i (fig. 114).

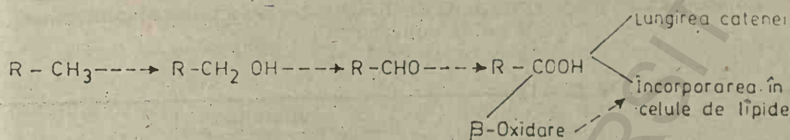


Fig. 114. Oxidarea monoterminală a *n*-alcanilor (Einsele, 1983).

În urma cercetărilor efectuate s-a observat că microorganismele cultivate e *n*-alcani cu un număr par de atomi de carbon conțin în lipidele lor cantiăți mai mari de acizi grași cu număr par de atomi de carbon, în timp ce microrganismele cultivate pe alcani cu număr impar de atomi de carbon posedă antități mai mari de acizi grași cu număr impar de atomi de carbon (Rehm i Reiff, 1981)

E r m a k ó v a și F i n o g e n o v a (1971) au demonstrat faptul că, a drojdiile crescute pe *n*-alcani, enzimele ciclului glicosilat au o activitate oarte mare, sugerîndu-se ideea că acest ciclu regenerează acetil-CoA în impul oxidării alcanilor.

Un fenomen interesant cuprinde activitatea catalazei, care poate fi ndusă de *n*-alcani și este localizată în microcorpusculi.

Activitatea catalazei, în special la drojdia *C. tropicalis* crescută pe *n*-alcani, este mult mai mare decît a celulelor crescute pe glucoză (Gmünder, 1979).

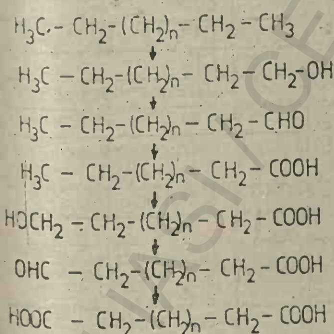


Fig. 115. Oxidarea determinală a *n*-alcanilor (Einsele, 1983).

4.4.6.3. CALEA OXIDĂRII DITERMINALE

Oxidarea diterminală, observată la unele bacterii și drojdii, a fost descrisă de E i n s e l e (1983) (fig. 115).

În prima treaptă are loc oxidarea unei grupe metil, la acidul gras corespunzător. A doua treaptă indică oxidarea grupei ω-metil, nesemnalizîndu-se formarea 1-ω-alcandiolului, alcandialdehidei sau a ω-hidroxialcanol.

4.4.6.4. CALEA OXIDĂRII SUBTERMINALE

Prima reacție a unei căi de oxidare subterminală implică formarea unui alcool secundar, urmată apoi de formarea unei cetone. Nu se știe nimic despre alcooloxidaza care catalizează această reacție. La drojdii nu a fost detectat un alt tip de oxidare subterminală decît aceea care apare în poziția C_2 a alcanilor cu catenă lungă (tabelul 67).

Tabelul 67 arată că intermediarii care sugerează căile de descompunere a alcanilor pot fi folosiți în scopuri taxonomice.

Tabelul 67

Compușii intermediari formați de diferite drojdii la descompunerea *n*-alcanilor superior (C_{10}—C_{18})

(după Rehm și Reiff, 1981)

Microorganismul	Căi terminale		1,2-Alchene	Căi subterminale			Observații
	Monoterminal	Diterminal		Numai poziția 2	Poziții 2,-3,-4-	Poziții 4,-5,-6-	
Pichia sp.	++	++					
P. haplophyla		+					C12
—		++					C13
C. albicans		++					C12
C. cloacae		++					C9-C18
C. guilliermondii		+					C13
—		++					C11—C16
—	+++						extracte celulare
C. intermedia		+++					C12
C. lipolytica				+			C14, C15, C16, C17, C18
—		++					C13
—	+++						metilcitrat
C. maltosa		++					C12, C13
C. parapsilosis		+++					C12
—		++					C13
—	+++			+			C12, C13, C14
—	+++			++			C15
—			+				extracte celulare : C14
C. rugosa		++					
—			+++				extracte celulare + NAD(P)H
C. tropicalis	+++	+	+				extracte celulare
—		+					
—	+++						extracte celulare
C. zeylanoides		+					C12
Rhodotorula sp.	+		+				C16
Torulopsis gropengiesseri	+++		exclus	+			extracte celulare

În concluzie, se pare că drojdiile care oxidează rapid alcanii acționează preferențial prin căile de tip terminal, iar cele care oxidează mai lent alcanii folosesc preferențial căile de tip subterminal.

4.5. ASPECTE CINETICE ALE CREȘTERII DROJDIILOR PE N-PARAFINE

În literatura de specialitate au fost propuse mai multe modele matematice care să explice cinetica de creștere a drojdiilor pe hidrocarburi lichide. Erickson și colab. (1969) au luat în considerare două cazuri pentru cultivarea drojdiilor consumatoare de *n*-alcani în sistem închis și anume:

— cazul în care substratul limitativ de creștere, considerat a fi *n*-alcanii, este dizolvat într-o fază dispersă și deci aria disponibilă a substratului din faza dispersă rămîne constantă în timpul fermentației;

— cazul în care faza dispersă lichidă este formată în întregime din substrat consumabil (*n*-alcanii); în această situație aria suprafeței de substrat, disponibilă pentru microorganism, scade pe măsură ce substratul este consumat.

În sistemele disperse, o parte din celule vor fi absorbite pe suprafața picăturii de parafină, iar altele vor fi suspendate în faza continuă. Considerînd cazul în care faza dispersă este constituită din substrat pur, celulele atașate la suprafața picăturii de parafină vor crește cu o viteză specifică egală cu viteza specifică maximă de creștere, obținută în condițiile în care toți nutrienții sînt în exces, iar cele suspendate în faza continuă vor avea o viteză specifică de creștere dată printr-o relație de tip Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}, \tag{240}$$

în care: S este concentrația de substrat în faza continuă, gl^{-1};

K_s — constanta de saturare, gl^{-1};

μ — viteza specifică de creștere, h^{-1};

μ_{max} — viteza specifică maximă de creștere h^{-1}.

Valoarea maximă a concentrației de substrat din faza continuă S_s se obține atunci cînd faza continuă este saturată cu nutrienți; prin înlocuirea acestei valori în ecuația (240) se obține:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_s}{S_s + K_s}. \tag{241}$$

Atunci cînd transferul de masă este important, iar viteza de creștere în faza continuă este limitată de cantitatea de substrat care difuzează în această fază, valoarea lui S poate fi mult mai mică decît S_s. Viteza maximă de transport a substratului în faza continuă apare atunci cînd $S=0$ în relația:

$$v_s = K_L A_p (S_s - S), \tag{242}$$

care descrie viteza de transfer de masă de la o picătură de arie A_p în faza continuă.

Pentru a elabora metodele care să descrie cinetica creșterii drojdiilor pe substrat pur de *n*-alcani, Erickson (1969) delimitează trei cazuri

specifice. Elaborarea modelelor cinetice în cele trei cazuri, se face în ipoteza : faza dispersă este constituită din substrat pur și implicit are loc scăderea ariei interfaciale datorită consumului de substrat. Primul caz presupune creștere la suprafață fazei disperse, al doilea caz creștere la interfață, iar al treilea caz creștere în faza continuă. Cel de al doilea caz are loc în ipoteza existenței echilibrului de substrat între cele două faze, în timp ce cel de-al treilea caz se desfășoară în ipoteza consumului de substrat în faza continuă limitat de viteza de transfer a substratului în această fază. Cele trei situații sînt prezentate sintetic în tabelul 68 și figurile 116, 117 și 118.

Tabelul 68

Modele de creștere a drojdiilor pe substrat pur de n-alcalini în sistem închis (Erickson și colab., 1969)

Ipoteza de creștere	Ecuațiile modelului matematic	Reprezentarea grafică
Creșterea pe suprafața picăturii de parafină (faza dispersă). Cazul studiat : creștere discontinuă pe suprafața unei singure picături de substrat pur	— $N = Ne\mu_{max}t$ (243) $N_0 \leqslant N \leqslant N_{cp}$ — $\rho_p \dfrac{dV_p}{dt} = -\dfrac{\mu_{max}N}{y}$ (244) $N_0 \leqslant N \leqslant N_{cp}$ — $Y = \dfrac{N - N_0}{\rho_p(V_{p0} - V_p)}$ (245)	fig. 116
Creșterea în faza continuă saturată cu substrat. Are loc în condiția $N \geqslant N_{cp}$. Dacă faza continuă rămîne saturată cu substrat, μ din ecuația (241) este constant și se notează cu μ'_s. Ipoteza este valabilă în perioadele inițiale ale creșterii, cînd concentrația celulelor în faza continuă este mică	— $\dfrac{dN}{dt} = \mu_{max}N_p + \mu'_s(N - N_p)$, $N \geqslant N_{cp}$ (246) — $\rho_p \dfrac{dV_p}{dt} = \dfrac{\mu_{max}N_p}{Y} -$ $- \dfrac{\mu'_s}{Y}(N - N_p)$, (247) $N \geqslant N_{cp}$	fig. 117
Creștere limitată de transferul de substrat din faza dispersă în faza continuă. Se consideră trei cazuri : 1) numărul picături = constant, în timpul fermentației discontinue, mărimea unei picături scade ; 2) distribuția mărimii picăturilor este constantă, dar scad în timp numărul de picături ; 3) aria suprafeței rămîne constantă pe măsură ce substratul se consumă	— $\dfrac{dN}{dt} = \mu_{max}N_p +$ $+ \dfrac{\mu_{max}S(N - N_p)}{K_s + S}$ (248) $\rho_p \dfrac{df_d}{dt} = -\mu_{max}\dfrac{N_p}{Y} -$ $- K_La(S_s - S)$ (249) — $Y = \dfrac{N - N_0}{\rho_p(f_{d0} - f_d)}$ (250)	fig. 118

Fig. 116. Curba de creştere în sistem discontinuu a celulelor de drojdie pe o picătură de substrat pur (Erickson şi colab., 1969).

Fig. 117. Curba de creştere în regim discontinuu, pe o picătură de substrat pur, cu echilibru de substrat între cele două faze lichide (Erickson, 1969).

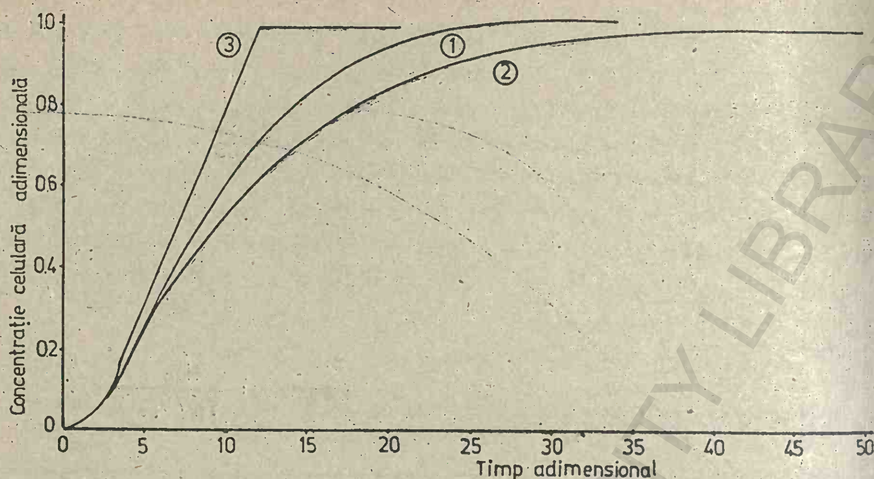


Fig. 118. Efectul ariei interfaciale asupra creșterii în sistem discontinuu, cazul creșterii limitate de transferul de substrat (Erickson și colab., 1969).

Se fac următoarele notații [relația dimensională] :

— $a(a_0)$ — aria (aria inițială) interfacială pe unitatea de volum $[L^{-1}]$;

— $f_d(f_{do})$ — fracția volumică de lichid (fracția inițială, respectiv, ocupată de faza dispersă) ; adimensională ;

— K_L — coeficientul de transfer de masă $[LT^{-1}]$;

— K_s — constanta de saturare $[ML^{-3}]$;

— $N(N_0)$ — numărul (numărul inițial, respectiv) de celule pe unitatea de volum $[L^{-3}]$;

— N_p — numărul de celule de pe suprafața picăturii, pe unitatea de volum $[L^{-3}]$;

— N_{cp} — numărul de celule de pe suprafața picăturii, pe unitatea de volum, la timpul t_p $[L^{-3}]$;

— S — concentrația de substrat în faza continuă $[ML^{-3}]$;

— S_s — concentrația de substrat în faza continuă saturată $[ML^{-3}]$;

— t — timpul $[T]$;

— t_p — timpul la care suprafața picăturii devine saturată cu celule $[T]$;

— $V_p(V_{po})$ — volumul (volumul inițial, respectiv) picăturii $[L^3]$;

— V_{cp} — volumul picăturii la timpul t_p $[L^3]$;

— Y — coeficientul de randament, exprimat ca număr de celule formate pe unitatea de masă de substrat $[U]$;

— ρ_p — densitatea, substratului $[ML^{-3}]$.

Modelele matematice elaborate pentru a descrie creșterea microbiană în sistem discontinuu ajută la aprecierea comportării microorganismelor în sistem continuu de cultivare, în chemostat.

Ca și pentru sisteme discontinue, E r i c k s o n (1969) consideră două cazuri în funcție de compoziția fazei disperse :

— numai o parte a fazei disperse este substrat consumabil de către microorganisme, caz în care modelele sînt elaborate în ipotezele compoziției variabile și a ariei interfaciale constante ale fazei disperse ;

— cînd faza dispersă este alcătuită în întregime din substrat consumabil (*n*-alcani), se consideră că aria interfacială a fazei disperse scade o dată cu consumul de substrat, pe cînd compoziția fazei disperse rămîne constantă.

Expresiile deduse pentru cinetica în sistem discontinuu pot fi folosite în bilanțurile de materiale pentru sistem continuu, cu amestecare perfectă: pentru: $N \leqslant N_{cp}$:

$$-\mathrm{DN} + \mu_{max} N = 0; \quad (251)$$

$$D(f_{d0} - f_d) - \frac{\mu_{max} N}{Y} = 0 \quad (252)$$

Pentru $N \geqslant N_{cp}$, bilanțurile de materiale au forma:

$$-DN + \mu_{max} N_p + \frac{\mu_{max} S(N - N_p)}{K_s + S'} = 0 \quad (253)$$

$$D\rho_p(f_{d0} - f_d) - \frac{\mu_{max} N_p}{Y} - K_L a(S_s - S) = 0 \quad (254)$$

$$D[(1 - f_{d0})S_0 - (1 - f_d)S] + K_L a(S_s - S) - \frac{\mu_{max} S(N - N_p)}{Y(K_s + S)} = 0 \quad (255)$$

unde:

D este rata de diluție $[T^{-1}]$; restul notațiilor corespund cu cele de la cultivarea discontinuă.

Pentru un sistem continuu, constanta de randament poate fi scrisă în următoarea formă (se neglijează substratul în faza continuă):

$$Y = \frac{N}{p(f_{d0} - f_d)}. \quad (256)$$

Aria interfacială pe unitatea de volum (a) poate varia o dată cu fracția volumică a fazei disperse. În lucrarea sa, Erikson (1969) consideră trei modele în funcție de valorile ariei interfaciale raportată la fracția volumică ocupată de faza dispersă. Cele 3 modele sunt:

A) $$\frac{a}{a_c} = \left(\frac{f_d}{f_{d0}}\right)^{2/3}; \quad (257)$$

— numărul de picături pe unitatea de volum rămîne constant, dar mărimea picăturii variază pe măsură ce substratul e consumat;

B) $$\frac{a}{a_0} = \frac{f_d}{f_{d0}}; \quad (258)$$

— distribuția mărimii picăturii rămîne constantă, dar variază numărul de picături;

C) $$\frac{a}{a_0} = 1; \quad (259)$$

— se consideră că aria interfacială este constantă.

În lucrarea amintită, Erickson (1969) dezvoltă trei modele pentru următoarele cazuri limită:

— creștere la interfață;

— creştere în faza continuă saturată în substrat;
— creşterea limitată de transportul de substrat în faza continuă;
— creşterea în faza continuă limitată şi de transportul de substrat şi de constanta de saturare.

În urma cercetărilor efectuate, E r i c k s o n (1969) trage concluzia că pentru fazele iniţiale ale creşterii sau în condiţii de concentraţie de substrat limitativ scăzută, consumul de n-alcani din faza apoasă devine important. În fazele tîrzii ale creşterii liniare devine importantă aria disponibilă din suprafaţa picăturii de n-parafine, dat fiind că viteza în faza de creştere liniară poate fi explicată numai prin contactul direct celulă-picătură de n-parafine.

M o o - Y o u n g şi S h i m i z u (1971) au considerat că creşterea celulară apare ca urmare a contactului direct celulă-parafină.

Ei definesc un potenţial P care apreciază acomodarea celulelor pe suprafaţa picăturii de hidrocarbură:

$$P = \frac{2\sqrt{3}}{3} \pi n_p (2,5 + \bar{d}^*)\bar{d}^*. \tag{260}$$

Dacă acest potenţial limitează creşterea celulelor, atunci se poate aplica o ecuaţie de tip M o n o d pentru a defini corelaţia între viteza specifică de creştere şi acest factor limitativ:

$$\mu = \mu_{amx} \frac{P}{K_p + P}, \tag{261}$$

unde:
— $d^* = d_p/d_c$ — raportul dintre diametrele picăturii de parafină şi al celulei;
— $\bar{d} = \sum_{i=1}^{m} n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$ — diametrul mediu „Sauter";
(d_i şi n_i) reprezintă diametrul şi numărul picăturilor din intervalul de mărime „i")
— K_p — constanta de saturare pentru potenţial.

Ataşarea microorganismelor consumatoare de hidrocarburi de picăturile de parafină duce, aşa cum s-a descris anterior, la formarea unor „flocoane biologice", constituite din celule, picături de hidrocarburi şi bule de aer. Ele sînt mai puţin dense decît mediul de cultură şi chiar în condiţii normale de agitare formează un strat distinct la suprafaţa mediului de cultură. În cultivările discontinue se observă o constituire progresivă a flocoanelor pe parcursul creşterii celulare, devenind maximă către sfîrşitul fazei de creştere lineară. O dată cu completa consumare a substratului nu se mai observă prezenţa flocoanelor. De asemenea, nu se observă prezenţa flocoanelor la rate mici de diluţie, în sistemele continue (Blanch şi Einsele, 1973).

Este importantă studierea comportării acestor flocoane biologice în timpul fermentaţiei datorită prezenţei celulelor în interiorul lor, ceea ce face ca etapa de contact între celule şi hidrocarbură sau cea a transferului de oxigen dizolvat să devină limitative de viteză în centrul acestor flocoane.

M o o-Y o u n g şi colab. (1971) au efectuat experimente cu o tulpină de *Candida lipolytica* pe substrat de n-dodecan, în vase cu agitare mecanică, pentru determinarea vitezei de consum a oxigenului din mediu (I_{O_2}), viteza de consum a oxigenului de către celule (Q_{O_2}), concentraţiei de oxigen dizolvat în mediul de fermentaţie (OD), precum şi relaţiile acestor parametri cu condiţiile de operare.

Rezultatele arată că valorile I_{O_2} au fost maxime la sfîrșitul fazei de creștere logaritmică, atunci cînd OD atinge un nivel minim în timpul fermentației pentru toate condițiile de agitare. Valorile maxime ale Q_{O_2} se ating în primele momente ale creșterii logaritmice, menținîndu-se pînă la sfîrșitul fazei logaritmice, după care scad brusc datorită epuizării hidrocarburii (tabelul 69).

Tabelul 69

Efectul condițiilor de agitare asupra vitezei specifice de creștere și valorilor maxime ale Q_{O_2} și I_{O_2}
(Moo-Young și colab., 1971)

Viteza de agitare [rpm]	Viteza specifică de creștere [h^{-1}]	Q_{O_2} max., [$mmoli \cdot g^{-1} h^{-1}$]	I_{O_2} max., [$mmoli \cdot l^{-1} h^{-1}$]
250	0,095	10,2	23
300	0,120	—	—
400	0,155	—	—
500	0,160	11	34,5
600	0,175	—	—
700	0,180	—	—
800	0,180	12	40

Figura 119 prezintă relația dintre viteza de consum a oxigenului și viteza specifică de creștere, obținută în condiții de fermentație continuă cu limitare de substrat. Din rezultatele experimentale, M o o-Y o u n g și colab. (1971) au dedus următoarea ecuație:

$$\frac{1}{x}\frac{dR}{dt} = Q_{O_2} = \alpha\mu + \beta \qquad (262)$$

unde: x este concentrația de celule în fermentator, $g \cdot l^{-1}$;
R — cantitatea de oxigen necesar, mmoli $O_2 \cdot l^{-1}$;
μ — viteza specifică de creștere, h^{-1};
α și β — constante empirice, unde β indică viteza de respirație endogenă.

Din figura 120 pot să se deducă valorile pentru α (71,5 mmoli $O_2 \cdot g^{-1}$) și β (0,6 mmoli $O_2 \cdot g^{-1} h^{-1}$). Figura 119 arată relația între viteza de consum a oxigenului și concentrația de oxigen dizolvat, figura 121 cuprinzînd o reprezentare Lineweaver-Burk a datelor din figura 117. S-au putut determina valoarea critică a concentrației de oxigen C_{crit} = = 1,2 ppm și constanta de saturare pentru oxigen dizolvat, K_m = $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ mmoli O_2/l.

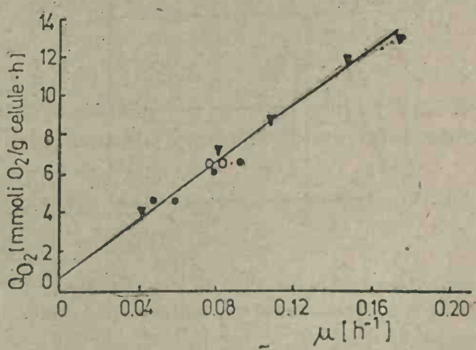


Fig. 119. Relația dintre viteza de consum a oxigenului și viteza specifică de creștere — fermentații continue — (Moo-Young și colab., 1971).

S-a observat experimental o scădere a valorii Q_{O_2}, în timpul fermentației, la valori ale concentrației de oxigen dizolvat în medii mai mari

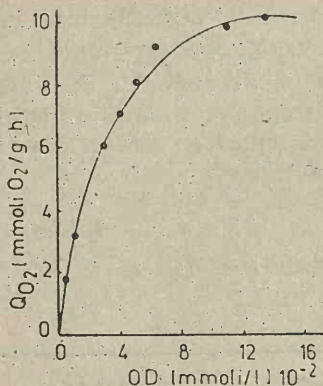


Fig. 120. Relația dintre viteza de consum a oxigenului și concentrația de oxigen dizolvat (Moo-Young și colab, 1971).

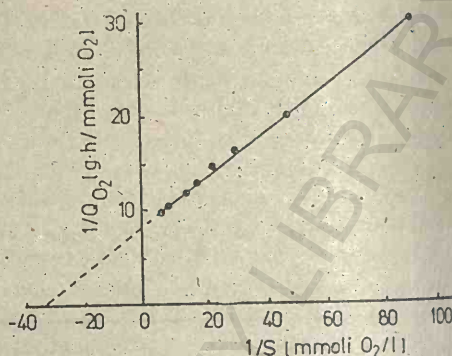


Fig. 121. Reprezentare Lineweaver-Burk a datelor din fig. 117 (Moo-Young și colab., 1971)

ca valoarea critică, ceea ce nu era de așteptat (Blanch și Einsele, 1973). Cauza constă în existența flocoanelor.

La valori mari ale agitării mecanice, aceste flocoane sînt distruse și factorul important devine rezistența filmului gaz-lichid. La valori scăzute ale agitării, rezistența la transferul oxigenului între celulele din interiorul flocoanelor devine etapă limitativă de viteză, dînd naștere la o valoare aparent mai mare a concentrației critice de O_2. Celulele din interiorul flocoanelor prezintă un contact deficient și cu hidrocarbura din cauza structurii flocoanelor. Prin realizarea unei turbulențe mărite, aceste flocoane sînt distruse, iar faza de creștere exponențială este mai lungă. Toate aceste particularități au efecte mult mai vizibile în cultivarea continuă.

B l a n c h și E i n s e l e (1973) au făcut experimentări în sitem continuu cu o tulpină de *Candida tropicalis*, în două tipuri de fermentatoare, la două concentrații de substrat (hexadecan) diferite și de la diferite rate de diluție. Rezultatele sînt prezentate în figurile 122, 123, 124, 125.

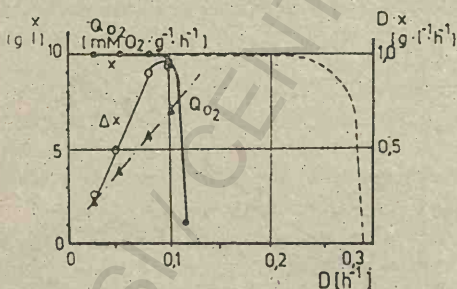


Fig. 122. Cultivare continuă cu *Candida tropicalis* (fermentator cu agitator, turbină cu palete plate ; agitare : 3 000 rpm ; aerare : 0,5 l/l/min ; $S_0 = 1{,}0\%$ (m/v). Pentru comparație, din curba dedusă din relația teoretică Monod rezultă : $\mu_{max} = 0{,}29$ h^{-1} ; $Y = 1{,}0$ g/g ; $K_s = 100$ mg/l (Blanch și Einsele, 1973).

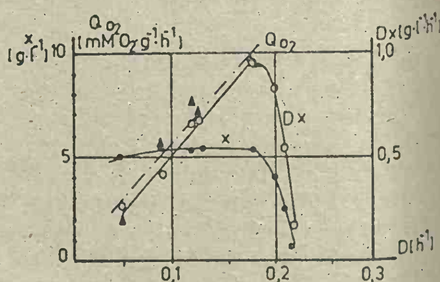


Fig. 123. Cultivare continuă în aceleași condiții ca în figura 122 ; $S_0 = 0{,}55\%$ (m/v).

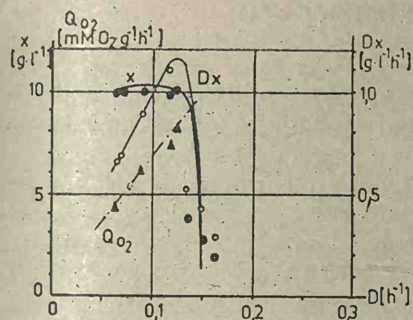


Fig. 124. Cultivare continuă cu sistem suplimentar de agitare mecanică; concentrația de substrat $S_0 = 1\%$ (m/v); agitare: 2 500 rpm; aerare = 0,5 l/l/min (Blanch și Einsele, 1973).

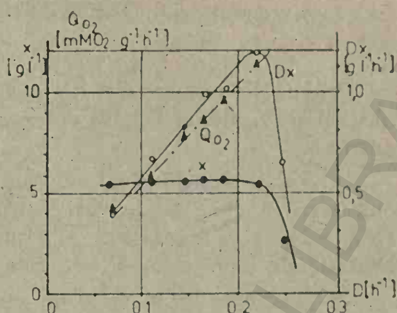


Fig. 125. Cultivarea continuă în aceleași condiții ca în fig. 124, cu concentrația de substrat în influent 0,55% (m/v).

Folosind un sistem de agitare tip turbină, cu palete plate și o concentrație de 1% hexodecan în influent, s-a observat spălarea culturii la o rată de diluție de 0,12 h^{-1} față de $\mu_{max} = 0{,}3$ h^{-1} (în discontinuu) (fig. 122). Micșorînd concentrația de substrat în influent la 0,55% hexadecan, spălarea culturii s-a observat la o rată de diluție de 0,22 h^{-1} (fig. 123). În ambele cazuri, în apropierea condițiilor de începere a spălării culturii, s-a observat formarea unor flocoane mari.

Folosirea suplimentră a unui sistem mecanic care îmbunătățește circulația fluidului în vas va duce și la creșterea ratei de diluție la care apare spălarea culturii, pentru ambele concentrații de substrat în influent (1% — fig. 123 și 0,55 fig. 124). Fenomenul se datorează probabil unei amestecări îmbunătățite în toată masa fluidului, precum și prevenirii formării de zone stagnante în reactor. Ca urmare se obțin și valori mai mari ale productivității.

În concluziile experimentărilor, Blanch și Einsele (1973) remarcă existența unei regiuni de creștere liberă pe substrat de hidrocarbură pură în funcție de gradul de agitare în fermentator. În faza de creștere exponențială vitezele de creștere sînt maxime, independent de viteza agitatorului. La viteze mici de agitare cu agitatoare tip turbină, s-a găsit că viteza de creștere în faza exponențială este funcție de turația agitatorului. În aceste cazuri se consideră că sînt răspunzătoare amestecarea incompletă și formarea flocoanelor.

Ca urmare a tuturor acestor observații, este necesar ca la realizarea unui model matematic care să descrie cinetica creșterii drojdiilor pe n-parafine, să se considere nu numai distribuția mărimii picăturilor în faza dispersă, dar și formarea flocoanelor biologice și amestecarea imperfectă din fermentator. Majoritatea lucrărilor publicate prezintă date de fermentație de substrat de n-alcan pur; în practica industrială se folosesc ca substrat anumite fracții de n-alcani lichizi, ceea ce complică și mai mult modelul matematic al procesului.

4.6. PROCESUL DE FERMENTAȚIE

Proiectele comerciale de producere a biomasei proteice cu drojdii pe substrat de *n*-alcani sînt în cea mai mare parte bazate pe tehnici de cultivare continuă.

Operarea continuă a bioreactorului permite menținerea unor condiții constante în ceea ce privește substratul, nutrienții, oxigenul dizolvat, agitarea, *p*H-ul, temperatura și concentrația de biomasă, în timp ce debitul constant de descărcare a produsului asigură condiții constante de separare.

În procesele industriale de producere a biomasei din hidrocarburi, cultivarea continuă are avantaje nete față de cultivarea discontinuă, deoarece este în concordanță cu producția rafinăriilor de petrol și cu operarea din obiectivele petrochimice mari, a căror parte componentă sînt în ultimul timp.

Prepararea nutrienților pentru procesele continue la care se operează în mod steril necesită sterilizarea tuturor debitelor de alimentare. Metoda obișnuită este tratamentul termic dar se poate folosi și filtrarea prin membrană pentru debite mai mici.

Folosirea proprietăților de autosterilizare a unor baze și acizi puternici pot asigura economii considerabile în costurile de producție.

4.6.1. MEDIUL DE CULTURĂ

Pentru procesul de fermentație la scară industrială se aleg elementele nutritive sub forma cea mai disponibilă, dar care să nu conțină elemente toxice, așa cum sînt în principal arseniul și plumbul (tabelul 70).

Tabelul 70

Cantitățile aproximative de materii prime necesare pentru un proces pe *n*-alcani
(Einsele, 1983)

Materia primă	Cantitatea aproximativă (kg/kg de biomasă uscată)	
	Motorină	*n*-Alcani purificați
Motorină	1,1	—
n-Alcani purificați	—	0,9
Amoniac, anhidru	0,16	0,14
H_3PO_4, 85%	0,086	0,052
Săruri minerale		
$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7\,H_2O$, $Mg \cdot SO_4 \cdot 7\,H_2O$, KCl, $ZnSO_4 \cdot H_2O$	0,032	0,022

Amoniacul este sursa de azot preferată pentru producerea de biomasă pe *n*-alcani; deoarece este folosit în controlul *p*H-ului, se manevrează ușor și are un preț scăzut.

Ca sursă de fosfor este preferat acidul fosforic.

Nutrienții minerali necesari : K, Mg, Mn, Zn și Fe, sînt folosiți mai mult sub formă de hidroxizi sau sulfați, decît sub formă de cloruri, pentru a minimaliza coroziunea echipamentelor din oțel inoxidabil.

Un proces esențial al proceselor de producere a biomasei din hidrocarburi îl reprezintă optimizarea componentelor mediului de cultură.

Pierderile provocate de ionii nemetabolizați pot fi parțial înlăturate numai în cazul schemelor de proces care includ recircularea efluentului provenit din treapta de separare. De aceea, cele mai dezvoltate programe își propun optimizarea mediului pentru îmbunătățirea performanței procesului și micșorarea consumurilor specifice de materii prime.

4.6.2. TRANSFERUL DE OXIGEN ȘI HIDROCARBURĂ

Biosinteza proteinelor din *n*-alcani este un proces eterogen cu participarea a patru faze nemiscibile, și anume : două faze lichide (hidrocarbură și apă), o fază solidă și o fază gazoasă.

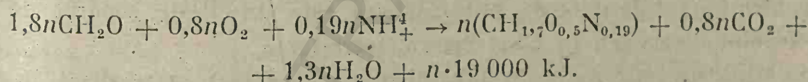
Asigurarea unor randamente în biomasă, de interes industrial, în procesul de biosinteză a proteinelor din *n*-alcani este strîns legată de transferul de oxigen și hidrocarbură din mediul de cultură prin pereții celulei microorganismului.

4.6.2.1. TRANSFERUL DE OXIGEN

Oxigenul necesar pentru oxidarea alcanilor de către drojdii este asigurat prin transfer de gaz. Acest necesar de O_2 este de peste două ori mai mare decît la sistemele bazate pe hidrați de carbon, în care substratul însuși asigură cam jumătate din oxigenul necesar pentru procesele metabolice.

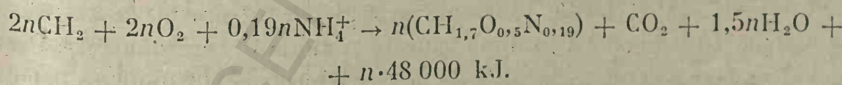
Ecuațiile stoichiometrice pentru hidrații de carbon și pentru hidrocarburi au fost descrise de E i n s e l e, 1983 :

— pentru glucoză :



$$1{,}8nCH_2O + 0{,}8nO_2 + 0{,}19nNH_4^+ \rightarrow n(CH_{1,7}O_{0,5}N_{0,19}) + 0{,}8nCO_2 + 1{,}3nH_2O + n\cdot 19\,000\ kJ.$$

— pentru hidrocarburi :



$$2nCH_2 + 2nO_2 + 0{,}19nNH_4^+ \rightarrow n(CH_{1,7}O_{0,5}N_{0,19}) + CO_2 + 1{,}5nH_2O + n\cdot 48\,000\ kJ.$$

Oxigenul necesar pe unitatea de biomasă produsă de microorganisme aerobe care cresc pe *n*-hexadecan este de 2,5 ori mai mare decît cantitatea de O_2 necesară pentru creșterea pe glucoză. De aceea, pentru o creștere bună pe *n*-alcani, sînt necesare viteze mari de transfer de oxigen (150—400 mmoli $O_2 \cdot L^{-1}h^{-1}$). Concentrația critică a oxigenului dizolvat în mediile care conțin hidrocarburi este aproximativ de 1,0—1,2 părți pe milion (p.p.m). De aceea, o limitare a aerării și a alimentării cu O_2 reduce productivitatea drojdiilor consumatoare de *n*-alcani.

Există două posibilități de creștere a solubilității oxigenului în mediul de fermentație și anume :

— prin creşterea presiunii lui parţiale, menţinînd o suprapresiune în interiorul bioreactorului, sau prin folosirea unui amestec de gaze care au un conţinut crescut de oxigen ;

— prin operarea într-un sistem cu fază uleioasă continuă, deoarece se presupune că oxigenul este mult mai solubil în hidrocarburi decît în apă.

Pe de altă parte s-a constatat că transferul oxigenului prezent în bulele de aer, dispersat în mediul de fermentaţie, este cu atît mai eficace, cu cît dimensiunile bulelor sînt mai mici.

Consumul de oxigen şi căldură degajată în fermentaţie, în funcţie de randamentul în substrat, sînt prezente în tabelul 71.

Tabelul 71

Efectul substratului şi al randamentului asupra consumului de oxigen şi al căldurii de reacţie
(Humphrey, 1970)

Microorganismul	Substratul	Randamentul celular : g·celule/ g·substrat	Consum O_2 : g·O_2/100 g celule	kcal degajate (pentru 100 g celule produse)
Drojdie	*n*-alcani	0,85	242	985
Drojdie	*n*-alcani	1,00	196	780
Drojdie	*n*-alcani	1,15	152	632

Se poate remarca că, atunci cînd randamentul celular este ameliorat, oxigenul consumat pe unitatea de biomasă şi, de asemenea, căldura degajată scad apreciabil.

4.6.2.2. TRANSFERUL DE HIDROCARBURĂ

Problema transferului de hidrocarbură este dificil de separat de cea a transferului de oxigen în acest sistem tetra-fazic.

Solubilitatea oxigenului în faza ulei-apă este mai mare decît în faza apoasă, iar în prezenţa hidrocarburilor condiţiile de interfaţă între aer şi apă sînt influenţate de variaţiile tensiunii superficiale. Procesul de transfer al *n*-alcanilor poate fi împărţit în două aspecte şi anume : emulsionarea substratului şi deci transportul molecular de hidrocarbură prin filmul de lichid în direcţia microorganismelor, şi ataşarea particulelor de substrat pe suprafaţa celulară şi transportul prin peretele celular.

Mecanismul de transport către celula microbiană. Un pas important în descompunerea alcanilor este emulsionarea substratului. Gradul de emulsionare este influenţat de cîţiva factori dintre care pot fi citaţi agenţii activi de suprafaţă şi agitarea mediului de fermentaţie în vas. De aceea, proiectarea optimă a bioreactoarelor şi agitatoarelor este esenţială pentru atingerea unei dispersii bune a hidrocarburii ca şi pentru transferul de oxigen.

Într-un sistem care conţine două faze lichide nemiscibile, amestecarea are un efect major asupra performanţei procesului de emulsionare.

În interiorul acestei emulsii pot fi vizualizate două căi fizice de transfer a hidrocarburilor la celulă: transferul la celulele complet înconjurate de faza apoasă și transferul la celulele direct atașate de picăturile de hidrocarbură.

Prin calcule de transfer de masă s-a avansat ideea că primul caz este treapta limitatoare de viteză în sistemele de creștere pe *n*-alcani.

Ulterior s-a luat în considerare viteza de adsorbție și desorbție a celulelor pe suprafața picăturilor de ulei, precum și transferul de substrat între faze (Erickson și colab., 1970). S-a găsit că adsorbția poate afecta în mare măsură creșterea; viteze mici de adsorbție a picăturillor de hidrocarbură au ca rezultat o perioadă de lag mult mai mare în creșterea discontinuă.

Distribuția mărimii picăturilor influențează, de asemenea, durata perioadei de creștere discontinuă, existența picăturilor mari avînd ca efect mărirea timpului de consum a substratului solubilizat. Distribuția optimă a mărimii picăturilor de *n*-parafină pentru creșterea drojdiilor este sub 30 μm, preferabil sub 10 μm.

Mecanismul de contact între celula microbiană și substratul de *n*-parafine. Prima etapă în asimilarea alcanilor de către microorganisme este prinderea alcanilor exogeni de către celule și transportul ulterior prin peretele celulelor la locul unde suferă oxidarea inițială. Mecanismul de transfer al *n*-alcanilor a fost studiat extensiv de Einsele și colab., (1975, 1979, 1983), Velankar (1975), Fukui și Tanaka (1981).

În ceea ce privește mecanismul prin care este produsă o emulsie de substrat insolubil în apă, trebuie făcută o distincție între o macroemulsie, care este produsă de eforturile de forfecare ale agitării mecanice, și o microemulsie care este formată de o substanță adițională produsă de către drojdii.

Macroemulsia conține picături de mărimea 1—100 μm, iar microemulsia este formată din picături cu diametrul de 0,01—0,5 μm, la interfața lichid-lichid în prezența emulsificatorilor produși uneori spontan de către microorganisme.

În cazul unei emulsificări quasispontane s-a stabilit că responsabilă pentru stabilitatea emulsiei este o barieră mecanică structurală. Această barieră este constituită din microemulsii formate spontan la interfața ulei-apă. Transferul de masă al cîtorva emulsificatori prin interfață și scăderea produsă în tensiunea interfacială locală conduce la emulsificare quasispontană și la formarea de micropicături la interfață.

Ușurința de a produce compuși activi de suprafață (emulsificatori) la nivelul membranei celulare este una dintre caracteristicile determinate ale asimilării *n*-alcanilor.

S-a stabilit că lipopolizaharidele izolate din pereții celulari ai microorganismelor care utilizează hidrocarburi joacă un rol important în procesul de asimilare (Kappeli și Fiechter 1980).

S-a găsit că acest polizaharid este un manan conținînd circa 4% acizi grași legați covalent.

Cercetări de microscopie electronică au arătat că celule de drojdie crescute pe *n*-alcani superiori sînt înconjurate de micropicături, Dar, picăturile de macroemulsie care sînt create prin efectul de forfecare al agitării mecanice nu sînt în contact direct cu celulele.

Microemulsia este creată la interfața fracției de alcan emulsionat de către un agent activ de suprafață care poate fi produs de celule. Transportul

unei astfel de micropicături se efectuează probabil prin difuzie turbulentă. Se presupune prezența unor poziții de legătură pe suprafața celulei, care ar permite aderarea microparticulelor. Acest gen de transfer la suprafața celulei poate fi mediat prin producerea de compuși activi de suprafață. Acești surfactanți pot asista la solubilizarea moleculelor de hidrocarbură și ajută la trecerea lor prin peretele celular spre locul inițial al oxidării. Studii asupra ultrastructurii celulelor de drojdie, asimilatoare de hidrocarburi, arată că pereții îngroșați ai celulei sînt traversați de canale care pot avea o natură chimică diferită, facilitînd transferul (Meissel și colab., 1976).

4.6.3. BIOREACTOARE

Bioreactoarele industriale folosite pentru producerea de biomasă din *n*-alcani pot fi clasificate în două grupe :

— bioreactoare cu agitare mecanică ;

— bioreactoare air-lift (tip Lefrancois).

Unele tipuri de bioreactoare prezintă o combinație între agitarea mecanică și tipul air-lift (fig. 126).

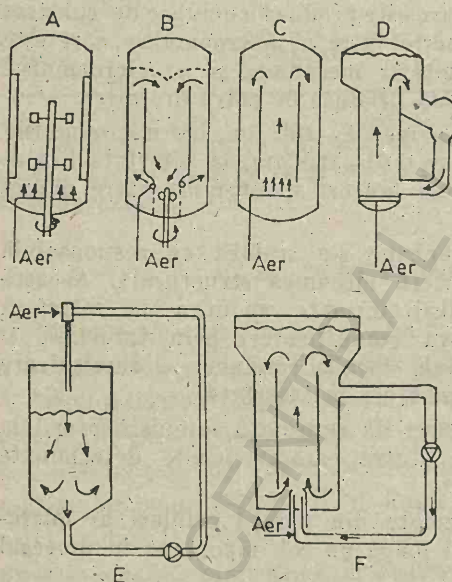


Fig. 126. Tipuri constructive de bioreactoare care au fost folosite în producerea de biomasă microbiană din hidrocarburi : *A* — vas cu agitare mecanică și șicane ; *B* — vas cu circulația fluidelor indusă prin agitare, prevăzut cu plăci perforate care induc emulsionarea mediului ; *C* — tipul de gaz-lift clasic ; *D* — tipul de gaz-lift Kanegafuchi ; *E* — aerator cu jet descendent ; *F* — reactor cu buclă externă de recirculare.

Bioreactorul cu agitare mecanică, cu șicane pe toată înălțimea, cu agitator-turbină în care aerul este introdus printr-un distribuitor, este cel folosit de Britich Petroleum pentru bioprocesul pe *n*-alcani dezvoltat în Scoția la scara de 300 m³ și de asemenea la trei vase de 3 000 m³ construite în Sardinia pentru proiectul „Italprotein".

Un proiect special pentru un fermentator cu agitare mecanică a fost construit de Einsele și Fiechter (1969). Acest tip de fermentator este prevăzut cu tub director și cu un sistem de agitare care induce o emulsionare a mediului. Lichidul este forțat să curgă înapoi către agitator, astfel încît substratul insolubil este dispersat în întreg reactorul.

Pentru substraturile de motorină, Britich Petroleum a folosit un sistem air-lift la care cel mai important parametru implicat în proiectul pentru acest substrat este corelația între viteza de ascensiune a mediului în tubul director

și productivitate, care sînt într-o relație lineară. Proiecte similare de air-lift clasic au fost folosite și de Institutul Francez de Petrol.

Există cîteva sisteme de air-lift modificate în care circulația mediului de fermentație din regiunea cu diametrul mai mare în brațul lateral este asigurată de forța aerului. Proiectul Kanegafuchi folosit pentru Liquichemica S.p.A. este un astfel de exemplu.

Un alt proiect special, aparținînd lui Vogelbusch, este o aplicație a aeratoarelor cu jet scufundat, care folosește o pompă bifazică deosebită, capabilă să transporte un amestec gaz-lichid omogen, cu o greutate specifică de 0,4—0,9 (Schreier, 1975).

Bioreactorul cu buclă de reciclare, proiectat de B l e n k e (1980), a fost de asemenea folosit în cultivarea drojdiilor pe substrat de *n*-parafine. Acest reactor constă dintr-un vas vertical, cilindric, cu un raport diametru-înălțime de 1 : 5 — 1 : 10 și prevăzut cu tub director concentric. Raportul optim între diametrul cilindrului interior față de diametrul exterior este 0,5—0,6. Tubul director este fixat în interiorul reactorului într-o astfel de poziție încît asigură o curgere continuă a fluidelor la baza și în vîrful lui. Deci este indusă o curgere circulară direcționată cu ajutorul unui jet de lichid.

Prin urmare, aceste modificări trebuie să asigure simultan un transfer suficient de oxigen, o dispersie eficace a fazei de hidrocarbură și, în același timp, să permită eliminarea căldurii de reacție.

4.6.4. PARAMETRII DE CULTIVARE

Biosinteza proteinelor în proces continuu la scară industrială este strîns legată de procesul de multiplicare a biomasei, respectiv faza de fermentație.

Aceasta a necesitat rezolvarea unor importante probleme tehnologice legate de alegerea unor parametri optimi de cultivare care să ducă la viteze și randamente mari în biomasă, eliminarea căldurii rezultate din fermentație, limitarea contaminării, recircularea efluentului etc.

4.6.4.1. TEMPERATURA CULTURII

Dezvoltarea optimă a unui microorganism are loc într-un interval de temperatură bine definit.

De obicei, un proces de fermentație pentru producerea de biomasă microbiană cu drojdii se desfășoară între 26 și 35°C. O creștere a temperaturii de lucru la 40°C, ar avea cîteva avantaje :

— costuri scăzute pentru echipamentul de răcire ;
— costuri energetice reduse pentru răcire ;
— menevrarea mai ușoară în regiunile cu climat mai cald ;
— contaminare mai redusă în cazul folosirii drojdiilor.

Problema răcirii este un punct critic în procesele de hidrocarburi. Pentru a menține o temperatură constantă în bioreactor, trebuie transferată căldura de la următoarele surse :

— căldura produsă de agitator (pentru amestecare și aerare) ;
— căldura produsă de metabolismul *n*-alcanilor.

De exemplu, necesarul de răcire estimat pentru procesele pe *n*-alcani purificați și motorină ale lui British Petroleum pentru capacitatea de 100 000 t/ /an este de aproximativ $4,6 \cdot 10^8$ kJ/h (Einsele, 1983).

În consecinţă, o temperatură de creştere de 30...32°C reprezintă o limitare serioasă. În multe părţi ale lumii, astfel de temperaturi nu pot fi realizate decît cu cheltuieli foarte mari pentru dispozitivele de răcire.

Un microorganism cu temperatură de creştere optimă mai mare decît 35°C (de exemplu pentru drojdii, în domeniul 40...45°C) va fi considerat valoros. În schimb, temperaturile de creştere mari pot avea şi alte consecinţe ca:

— reducerea dimensiunilor celulelor cultivate ;

— modificarea compoziţiei microorganismelor, prin schimbarea profilului de zaharuri, lipide sau acizi graşi.

O metodă de estimare a cantităţii de căldură produsă în bioprocesul de hidrocarburi este bazată pe măsurarea căldurilor de ardere a hidrocarburilor şi a biomasei. K a n a z a w a (1975) presupune că numai hidrocarburile trebuie considerate ca materie primă, drojdiile fiind considerate ca produs ; restul de materiale pot fi neglijate, cel puţin din punct de vedere al bilanţului termic :

Se poate scrie formula :

$$H = \frac{C_s}{Y_{x/s}} - C_x, \tag{263}$$

în care: H este căldura dezvoltată prin metabolism (kJ/kg de drojdie produsă);
C_s — căldura de ardere a hidrocarburilor (kJ/kg;
C_x — căldura de ardere a drojdiei uscate (kJ/kg) ;
$Y_{x/s}$ — randamentul de transformare a hidrocarburilor în biomasă (kg/kg).

Din aceste măsurători, K a n a z a w a (1975) a calculat :

— căldura de arderea a biomasei uscate este de circa 20 000 kJ/kg;

— căldura de ardere a hidrocarburilor este de circa 48 000kJ/kg.

De aici se poate calcula căldura produsă într-un bioproces cu drojdii pe *n*-alcani :

$$H = \frac{48\,000}{Y_{x/s}} - 20\,000. \tag{264}$$

Pentru a menţine temperatura optimă de creştere în bioreactor, această mare cantitate de căldură produsă este îndepărtată prin diverse mijloace de răcire.

Pentru găsirea condiţiilor optime de producţie a masei celulare s-au luat în considerare următorii parametrii de creştere :

— viteza specifică de creştere :

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}[h^{-1}], \tag{265}$$

t_d — timpul de dublare a concentraţiei celulare (h^{-1}) ;

— randamentul de transformare $Y_{x/s}$, exprimat prin :

$$Y_{x/s} = \frac{\text{kg biomasă produsă}}{\text{kg hidrocarbură consumată}}; \tag{266}$$

— proteina brută din biomasă, exprimată prin :

$$Cp\% = \%N \cdot 6{,}25 ;$$

Tabelul 72

Parametrii de creştere ai unor tulpini de *Candida* pe *n*-alcani
(Einsele, 1983)

Microorganismul şi substratul	Scara de lucru şi condiţii de operare	Temperatura (°C)	*p*H	Viteza specifică de creştere sau rata de diluţie (*D*) (h^{-1})	Dsnşitatea celulară (g/L)	Randamentul (g/g)	Productivitate (g/h/L) pentru cultură continuă
Candida intermedia	Discontinuu : 1L 1 525 r.p.m.	30	5,5	0,143—0,23	10—12	0,75—0,90	
Candida lipolytica (C_{14}—C_{16} : *n*-Alcani)	Discontinuu : 14L 1 500 r.p.m.	25	5,5	0,22	13,5	0,90	
Candida lipolytica (C_{19}—C_{16} ; *n*-Alcani)	Continuu : 1800L 1,5 VVm	32	5,5	0,16 (D)	23,6	0,88	3,78
Candida tropicalis (*n*-Alcani)	Continuu 50 000L	30	3,0	0,15—0,24	10—30	1,0—1,1	1,7—3,0
Candida tropicalis (*n*-Hexadecan)	Discontinuu 14L : 1 VVm ; 3 500 r.p.m.	30	4,5	0,29	10	1,0	—
	Continuu : 14L 1 VVm ; 3 000 r.p.m.	30	4,5	0,10	10	1,0	0,95

— rata de diluție, exprimată prin :

$$D = \frac{\text{debitul de alimentare cu lichide } [Lh^{-1}]}{\text{volumul total delucru din bioreactor (L)}}; \quad (267)$$

— productivitatea :

$$P = DX[gL^{-1}h^{-1}], \quad (268)$$

unde : X este concentrația de biomasă uscată (gL^{-1}).

În tabelul 72 sînt prezentați parametrii de creștere ai unor tuplini de drojdii pe hidrocarburi lichide în experimente de laborator și pilot industrial.

4.6.4.2. pH-UL ȘI CONTAMINAREA

Un rol la fel de important asupra vitezei de creștere a randamentului în biomasă îl are *p*H-ul.

Levurile prezintă avantajul de a crește convenabil în medii de cultură acide, domeniul cel mai favorabil de *p*H fiind cuprins între 3 și 5,5, în care cele mai multe specii de bacterii nu se dezvoltă.

Problema care se pune este dacă procesul trebuie să fie operat în condiții sterile sau nesterile. O operare sterilă este obligatorie cînd este cultivată o tulpină selectată. În rest, condițiile sterile sînt cel mult restrînse la treapta de propagare a procesului, treapta de separare fiind operată în condiții igienice normale. O operare nesterilă necesită selectarea acelor condiții de proces care să ducă la o creștere optimă a microorganismelor primare și la una minimală a contaminanților în mediul de cultură. Acești contaminanți se introduc în principal prin sistemele de aer și apă.

4.6.4.3. DENSITATEA CELULARĂ

S-a observat că o densitate celulară ridicată nu antrenează în mod necesar o productivitate ridicată, deoarece această productivitate depinde de rata de diluție. Pe de altă parte, o densitate celulară ridicată este importantă pentru reducerea costului de recoltare a celulelor.

Dacă mediul nutritiv conține în exces toți nutrienții necesari creșterii și dacă în el nu se formează metaboliți inhibitori ai creșterii, atunci un factor limitant va fi accesul oxigenului într-o populație celulară foarte densă. Pe substrat de *n*-alcani puri, densitatea celulară în cazul drojdiilor atinge valori mari, în jur de 25 g/l, deoarece se formează puțini metaboliți inhibitori.

În cazul substratului motorină, situația este foarte complexă. Se observă că densitatea celulară nu are o valoare prea mare deoarece se formează cantități mari de inhibitori de tipul acizilor grași, lineari sau ramificați, care sînt produși intermediari ai metabolismului.

Acțiunea inhibitoare a acizilor grași solubili este explicată prin adsorbția lor pe situsurile enzimatice active ale celulelor de drojdie (Champagnat, 1974).

Viteza specifică maximă de creștere a drojdiilor pe hidrocarburi este mai mică în comparație cu acelea crescute pe hidrați de carbon. Einsele și colab. (1983) arată că un necesar mai mare de oxigen pentru oxidarea hexadecanului implică o viteză mai scăzută de sinteză a biomasei (tabelul 73).

Date experimentale comparative ale creșterii drojdiei *Candida tropicalis* pe hexadecan și pe glucoză (1% greutate volum)
(Einsele și colab., 1983)

Parametrii	U.M.	Glucoză	*n*-hexadecan
Randament	g (substanță uscată) / g (substrat)	0,51	0,98
Viteza specifică de creștere maximă (μ_{max})	h^{-1}	0,68	0,28
Consumul de O_2	mmoli O_2/h/g (substanță uscată)	11,2	14,0
Coeficient de respirație (*RQ*)		1,0	0,46

Variația ratei de diluție, deci a ratei de creștere, are consecințe asupra compoziției masei celulare, în special asupra conținutului în proteine, lipide și acizi nucleici.

Conținutul în acizi nucleici este in legătură directă cu rata specifică de creștere, putîndu-se limita acest conținut prin rate de diluție moderate.

4.7. SEPARAREA BIOMASEI

La ieșirea din fermentator, mediul de cultură este format dintr-o fază apoasă continuă unde sînt dispersate celulele de drojdie, eventuale resturi de hidrocarburi, constituenți minerali și bule de aer.

Îndepărtarea apei din lichidul de fermentație, care conține aproximativ 10—30 g de biomasă la litru, este un procedeu dificil și complex. În procesele de substrat de *n*-alcani separarea produsului microbian se face de obicei prin centrifugare și spălare.

Pentru că *n*-alcanii sînt aproape complet consumați de către drojdii, îndepărtarea *n*-parafinei reziduale și separarea produsului finit nu este o problemă ca în cazul procesului pe motorină.

Procesul de separare în cazul proceselor pe motorină este mult mai complicat, pentru că 70—90% din hidrocarburi nu sînt metabolizate și trebuie îndepărtate din biomasă. În treapta de decantare, microorganismele se ridică în partea de sus a fazei uleioase, unde sînt dezaerate, înainte de a fi trimise la centrifugare. Aceasta este urmată de uscare și îndepărtarea motorinei prin filtrare continuă în contracurent cu solvenți.

Celulele recoltate prin centrifugare se prezintă sub forma unei „creme de drojdii“ cu o concentrație de 150—250 g/l. Uscarea celulelor se face prin evaporarea unei cantități importante de apă sub un vid parțial în evaporatoare clasice. Uscarea finală are loc prin atomizare. Parametrii esențiali ai operației de atomizare sînt temperatura și debitul de aer cald introdus în atomizor. Aparatele moderne sînt dotate cu sistem de reglare automată pentru asigurarea unei producții constante sub aspect cantitativ și calitativ.

Costul operațiilor de separare a biomasei microbiene este influențat de unii factori cum sînt separarea masei celulare din mediul de cultivare, recircularea substratului nefolosit și tratamentul termic în timpul prelucrării care nu trebuie să afecteze calitatea biomasei.

În final, procesul de separare și prelucrare trebuie să conducă la un produs cu un conținut scăzut în contaminanți și fără microorganisme patogene.

4.8. PROCEDEE DE FABRICARE A PROTEINELOR DIN N-ALCANI

Interesul care există pentru dezvoltarea comercială a producerii de biomasă microbiană din *n*-alcani este evidențiat de numeroasele patente deținute de multe firme.

Cele mai multe dintre aceste patente care se referă la procese dezvoltate la scară de pilot seminidustrial sau de pilot industrial folosesc drojdiile, în special specia *Saccharomycopsis (Candida) lipolytica*.

4.8.1. PROCEDEUL BRITISH PETROLEUM

Acest procedeu utilizează *n*-parafine separate cu site moleculare din tracțiuni petroliere cu intervalul de distilare de 220...230°C.

Procedeul prezentat în fig. 127 se desfășoară în condiții sterile. Soluțiile apoase de săruri minerale și factori de creștere sînt alimentate continuu, printr-un sterilizator. Aerul este introdus în bioreactor printr-un filtru sterilizant. *p*H-ul se menține automat la valoare constantă prin alimentarea continuă a amoniacului gazos în linia de aer. Căldura dezvoltată în timpul procesului este îndepărtată printr-un schimbător de căldură.

Produsul este scos continuu cu debit constant și este concentrat pînă la 15—20% substanță solidă. Crema de drojdii este apoi pasteurizată și atomizată.

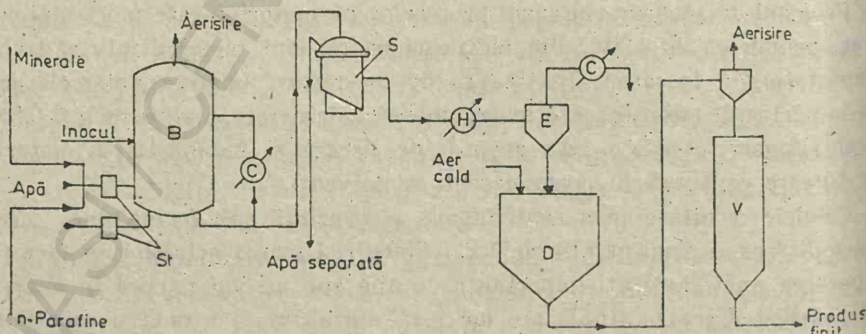


Fig. 127. Procedeul British Petroleum de fabricare a proteinelor din *n*-parafine: *S* — separator; *St* — sterilizator; *C* — răcitor; *B* — bioreactor; *H* — încălzitor; *E* — evaporator; *D* — uscător; *V* — vas stocare (Einsele, 1983).

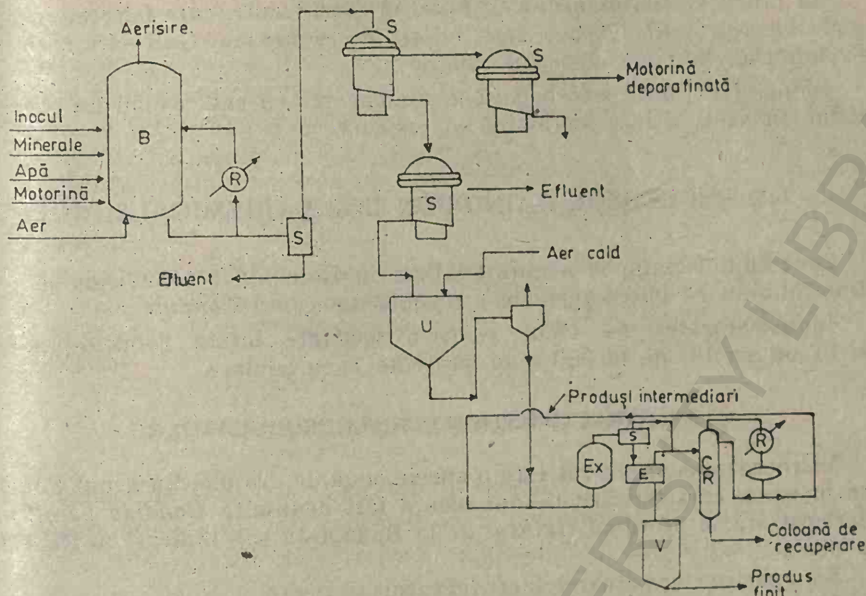


Fig. 128. Procedeul Institutului Francez de Petrol de fabricare a proteinelor pe substrat de motorină :

B — bioreactor ; *R* — răcitor ; *S* — separator ; *U* — uscător ; *Ex* — extractor ; *Ev* — evaporator ; *V* — vas stocare (după Champagnot, 1974 şi Einsele, 1983).

4.8.2. PROCEDEUL INSTITUTULUI FRANCEZ DE PETROL

Acest procedeu foloseşte ca substrat motorina. Schema de flux tehnologic este prezentată în fig. 128.

Fermentaţia este realizată în patru fermentatoare care sînt alimentate cu mediu mineral şi motorină nesterilizate. În fluxul continuu *p*H-ul este menţinut la o valoare mai mică de 6 prin injecţie de amoniac. Fosforul este furnizat sub formă de acid ortofosforic. Temperatura de proces este menţinută la 30°C, printr-un schimbător de căldură exterior în care se foloseşte apă de mare.

Din motorină sînt consumate în procesul de fermentaţie numai *n*-parafinele, iar restul de hidrocarburi, în proporţie de 70—80%, trebuie îndepărtate din produs în faza de separare. Debitul de produs merge mai întîi la un vas în care drojdiile sînt decantate şi dezaerate, de unde sînt trimise la centrifugare, operaţie prin care cea mai mare parte a motorinei este îndepărtată. Apoi drojdia este uscată, urmele de motorină fiind îndepărtate prin extracţie continuă în contracurent cu solvenţi. În final solvenţii sînt stripaţi din celule în uscătoare şi recuperaţi prin distilare pentru a putea fi refolosiţi.

Un alt procedeu în două trepte este folosit în Japonia de către Kanegafuchi Chemical Industry Co. Ltd. Procesul de fermentaţie se desfăşoară în flux continuu; primul bioreactor conţine o bacterie, iar al doilea o drojdie, efluentul de la separare fiind recirculat în primul vas de fermentaţie.

Un procedeu continuu de cultivare, în două trepte, care folosește drojdia *Saccharomycopsis lipolytica* a fost folosit de compania Gulf Research and Development în bioreactoare de 50 m³.

Biomasa obținută este bogată în aminoactzi cu sulf, avînd un conținut crescut în azot, lizină, metionină și cisteină.

4.8.3. PROCEDEUL DAINIPPON INK & CHEMICALS INC

Concernul Dainippon a industrializat în Român'a o tehnologie pe *n*-parafine folosind ca microorganism o drojdie din genul *Candida*.

Industrializarea s-a făcut printr-o societate mixtă româno-japoneză pentru un modul de 60 000 t/an proteine monocelulare.

4.8.3.1. CARACTERISTICILE SUȘEI PRODUCĂTOARE

Microorganismul utilizat este o specie nouă de drojdie din genul *Candida* care în urma caracterizării taxonomice a fost denumită *Candida paraffinica* și înregistrată în acord cu tratatul de la Budapesta sub indicativul FERM-P No. 3255.

Ea aparține următoarei încrengături :

Eumycete
  Deuteromycete
    Cryptococcales
      Cryptococcidee
        Candida...

Această sursă nu formează ascospori și arthrospori, nu produce carotenoizi, se propagă prin înmugurire multipolară și formează pseudomicelii în anumite condiții de carență, fiind clasificată ca o drojdie asporogenă aparținînd genului *Candida*

Din punct de vedere morfologic celulele sînt sferice, ovale sau alungite cu diametrul de 1—15 microni.

*p*H-ul tolerant este între 2 și 9,0, cu valoarea optimă cuprinsă între 4,0 și 5,0, iar temperatura tolerantă este între 10 și 40°C, valoarea optimă fiind 28...35°C.

4.8.3.2. CARACTERISTICILE MEDIULUI NUTRITIV

Materiile prime utilizate sînt :

— *n*-parafine ca sursă de carbon și energie ;

— amoniac gaz ca sursă de azot ;

— fosfat amoniacal ca sursă de fosfor ;

— sulfat de potasiu și hidroxid de potasiu ca sursă de K ;

— sulfat de magneziu ;

— oligoelemente formate din sulfat de zinc, sulfat de Cu, sulfat de mangan, sulfat feros, azotat de calciu.

Alte oligoelemente ca : B, Se, Mo, Co provin din apa folosită în procesul de producție.

Caracteristicile acestor materii prime se referă la puritatea lor în vederea obținerii unui produs lipsit de toxicitate.

4.8.3.3. STABILITATEA BIOPROCESULUI

Stabilitatea procesului tehnologic este garantată de menținerea parametrilor în intervale strînse, ceea ce garantează producții de proteină monocelulară cu caracteristici constante pe perioade mari de timp, 60—120 zile.

Stabilitatea sușei în microclimatul din fermentator pe perioade lungi se caracterizează indirect prin produsul finit și anume prin distribuția aminoacizilor, care la apariția unei schimbări mutagene își schimbă proporția sortimentală.

Controlul stabilității sursei se efectuează direct prin analiza unui component celular, și anume mananul din membrana celulară prin rezonanță magnetică cu protoni. Acest test diferențiază exact un număr de circa 40 specii de *Candide*.

4.8.3.4. PARAMETRII DE OPERARE AI BIOPROCESULUI

Schema de flux tehnologic este prezentată în fig. 129.

Acest procedeu a fost conceput să se desfășoare în condiții sterile și să asigure o rată ridicată de transfer a oxigenului, un sistem de răcire eficient și o dispersie bună a *n*-parafinelor.

Procedeul se desfășoară în circuit închis cu o probabilitate de contaminare nesemnificativă.

La început întreaga instalație utilizată în procesul de fermentație, compusă din fermentatoare, răcitoare de biomasă, sterilizatoare, conducte etc., se spală și se sterilizează cu apă fierbinte și abur.

De asemenea, se sterilizează toate componentele mediului de cultură, înainte de a fi introduse în fermentator.

Aerul se comprimă și se purifică prin filtrare pe filtre cu porozitate de 0,2 μm.

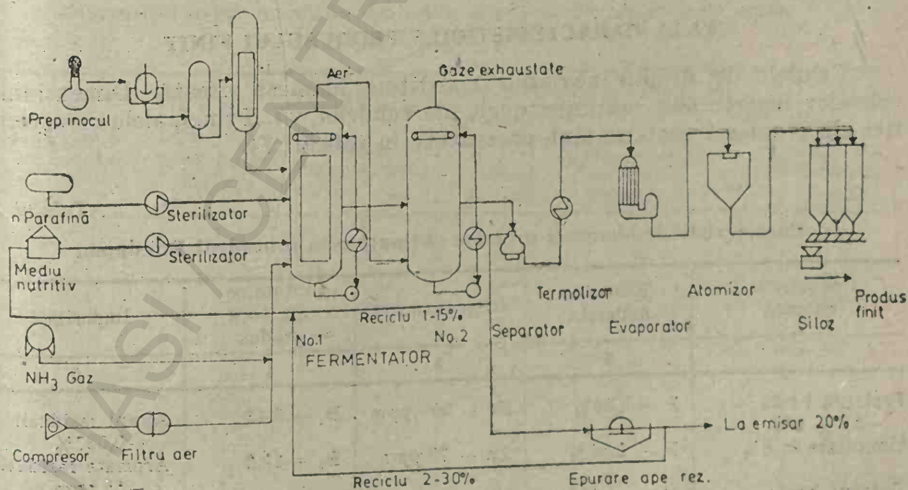


Fig. 129. Procedeul Dainippon de obținere a proteinelor din drojdii pe *n*-parafine.

Faza productivă continuă este precedată de faza discontinuă de creştere a concentraţiei de biomasă care se desfăşoară în fermentatoare de inocul în 5 trepte:

— *faza laborator* în flacoane agitate la temperatura de 35°C, pînă ce concentraţia celulară ajunge la 15—20 g/l;

— *faza de inocul* în fermentatoare „Jar“ cu volum de 37—100 l, de asemenea pînă la concentraţii de 15—20 g/l;

— *faza de inocul secundar*, cu volum util de 2 m³;

— *faza de inocul terţiar* cu volum util de 20 m³, care se desfăşoară în fermentatoare metalice de tip coloană cu barbotare sau gaz-lift;

— *ultima fază* de inoculare are loc chiar în fermentatorul de producţie cînd, după inoculare cu inocul terţiar, se realizează discontinuu creşterea biomasei pînă la concentraţia de 20 g/l, fază în care se reglează şi concentraţiile elementelor nutritive pînă la nivelul fazei de cultivare continuă.

Rata de inoculare este de 2,5—10%.

Faza continuă de fermentaţie se efectuează într-o baterie de două fermentatoare, din care primul fermentator este de tip gaz-lift şi realizează 85—90% din întregul ciclu de fermentaţie, iar cel de al doilea de tip coloană cu barbotare este prevăzut pentru perfectarea conversiei materiilor prime pînă la un nivel tehnic rentabil.

Rata de aerare este de 0,7 l/l/min, cu menţiunea că cea mai mare parte a cantităţii de aer este necesară pentru ridicarea biomasei în fermentatorul gaz-lift, deci are rol dinamic.

Biomasa cu o concentraţie de 20 g/l se centrifughează, obţinîndu-se o „cremă de levuri“ cu 120 g/l substanţă uscată, după care se termolizează pentru spargerea peretelui celular, se concentrează mai departe pînă la 24% prin evaporări în vid şi, în final, se usucă prin atomizare.

Controlul automat al parametrilor pe flux garantează calitatea şi cantitatea produsului finit, lipsa de contaminare, absenţa drojdiei producătoare viabile, cît şi lipsa impurificatorilor toxici (metale grele, aromate cancerigene, toxine).

4.8.3.5. CARACTERISTICILE PRODUSULUI FINIT

Celulele de drojdie neviabile constituie biomasa uscată. Dimensiunile celulelor moarte sînt mai mici decît ale celulelor vii. Principalele caracteristici ale biomasei proteice sînt prezentate în tabelul 74.

Tabelul 74

Caracteristicile biomasei proteice obţinute prin procedeul Dainippon

Compoziţia chimică	Elemente minerale	Oligoelemente	Vitamine mg/100g produs	Impurităţi
1	5	3	4	5
Proteină brută — −53 ± 2%	P — 2,06%	Fe — 300 ppm	B_1 — 0,13	Alcani reziduali —0,037%
Umiditate < 8%	K — 2,59%	Zn — 70 ppm	B_2 — 12,2	Aromate reziduale —55 ppm
Grăsimi brute 7 ± 2%	Mg — 0,21%	Mn — 25,3 ppm	B_6 — 2,27	

Tabelul 74 (continuare)

1	2	3	4	5
Cenușă brută 9 ± 2%	Ca — 0,043%	Cu — 7,2 ppm Pb — 4,0 ppm	B_{12} — 1,26 × × 10^{-3} Acid nicotinic 65,9	3, 4 Benzopiren — 0,5 ppb 1, 2, 5, 6, Dibenzantracen N.D. 20 Metilcolanten — N.D.
Fibră brută 5 ± 2% Digestibilitate minimum 90%		As — 0,2 ppm F — nedetectabil Hg — nedetectabil	Biotină — 0,13 Ac. folic — 0,31 Inositol — 4,7·10² Ac. pantotenic — 22,5	

N.D. — nedetectabil; ppm — părți per milion; ppb — părți per bilion.

Produsul absoarbe umiditate din atmosfera de stocare, astfel că după 30 zile de stocare într-o atmosferă cu 70% umiditate relativă, umiditatea produsului crește de la 4 la 17%.

4.9. VALOAREA NUTRITIVĂ ȘI INOCUITATEA

Cercetările biologice efectuate asupra biomasei protetice a drojdiilor crescute pe *n*-alcani au stabilit că acestea au o valoare nutritivă comparabilă cu cea a proteinelor din alimentele de bază, evidențiindu-se conținutul mare în aminoacizi esențiali, indispensabili creșterii și funcționării normale ale organismelor animale și umane (tabelul 75).

Tabelul 75

Compoziția în aminoacizi a drojdiilor și a unor alimente de uz uman
(Einsele, 1983)

Aminoacidul	Conținutul (g/16 g azot) de aminoacizi în					
	Drojdii de uz animal Toprina 9	*Kanegafuchi-Liquichimica*	Proteine tradiționale de uz animal		Proteine de uz uman	
			Făină de pește	Extract de soia	Ouă	Referință F.A.D.
Izoleucină	5,1	4,6	4,6	5,4	6,7	4,2
Leucină	7,4	7,1	7,3	7,7	8,9	4,8
Fenilalanină	4,3	4,3	4,0	5,1	5,8	2,8
Tirozină	3,6	3,8	2,9	2,7	4,2	2,8
Treonină	4,9	5,4	4,2	4,0	5,1	2,8
Valină	5,9	5,5	5,2	5,0	7,3	4,2
Arginină	5,1	5,1	5,0	7,7	—	—
Histidină	2,1	2,4	2,3	2,4	—	—
Lizină	7,4	7,0	7,0	6,5	6,5	4,2
Cisteină	1,1	1,5	1,0	1,4	2,4	2,0
Metionină	1,8	1,4	2,6	1,4	5,1	2,8
Triptofan	1,4	1,0	1,2	1,5	1,6	1,4
Total acizi cu sulf	2,9	2,9	3,6	2,8	7,5	4,8

Valoarea nutritivă a biomasei din drojdii crescute pe *n*-alcani a fost evaluată pe diverse specii de animale, de la rozătoare la animale domestice, incluzînd pui, găini ouătoare, purcei.

Valorile biologice tipice pentru tulpini de *Candida lipolytica* crescute pe *n*-alcani sau motorină sînt 61, respectiv 54. După suplimentare cu 0,3% D,L-metionină, valorile biologice corespunzătoare sînt 91 și respectiv 96. Aceste valori pot fi comparate cu 65, respectiv 97, pentru proteine din soia și ou uscat (tabelul 76).

Tabelul 76

Utilizarea proteinei nete, digestibilitatea reală și valoarea biologică a substanțelor proteice cu sau fără adaos suplimentar de metionină

(Levi și colab., 1979)

Substanțe proteice	Utilizarea netă a proteinei	Digestibilitate reală	Valoarea biologică
Drojdie British Petroleum Toprina G.	59	96	61
Drojdie British Petroleum Toprina S + 0,3% D,L-Metionină	88	96	91
Drojdie, uz uman	41	88	46
Drojdie uz uman + 0,3% D,L-Metionină	87	90	96
Proteină comercială din soia	42	100	42
Proteină comercială din soia + 0,3% D,L-Metionină	64	99	65
Ou uscat	90	100	90
Ou uscat + 0,3% D,L-Metionină	97	100	97

Un interes deosebit îl prezintă și vitaminele hidrosolubile din grupa B, care fac să crească valoarea biologică a drojdiilor pe *n*-parafine.

De asemenea, provitaminele D se găsesc într-un procent suficient de mare care asigură levurilor iradiate proprietăți antirahitice.

În afară de proteine și vitamine, în compoziția lor mai intră și alți produși valoroși, cum ar fi : glucide, lipide, substanțe minerale.

Inocuitatea. Scopul testelor de toxicitate a biomaselor proteice este de a evalua riscul potențial pentru animale și om.

Pentru că unii compuși aromatici, policiclici, sînt recunoscuți ca agenți cancerigeni și sînt prezenți în petrol, conținutul în acești compuși din biomasa microbiană a fost intens studiat.

Drojdiile care cresc pe motorină și *n*-alcani puri conțin nivele minime de compuși aromatici policiclici la fel ca și drojdiile alimentare (Levi și colab., 1979).

În procesele pe substrat de n-alcani purificați, se folosesc în mod obișnuit parafine care conțin în total mai puțin de 40 ppm compuși aromatici (tabelul 77).

Tabelul 77

Standardele recomandate pentru biomasa proteică
(I.U.P.A.C., 1979)

Benzopiren (ca indicativ pentru prezența hidrocarburilor aromatice policiclice)	< 5 ppb
Acetilacetonă, substanță cu reacție pozitivă (pentru formaldehidă)	< 20 ppm
Pentru biomasă proteică din alcani :	
total hidrocarburi	< 0,5%
total hidrocarburi aromatice	< 0,05%

Substratul folosit de British Petroleum pentru producerea biomasei din n-alcani conține mai puțin de 1 ppb (adică la limita inferioară de detecție) de 3,4-benzopiren, 1,2,5,6-dibenzantracen sau metilcolantren. Acești 3 compuși nu se regăsesc în biomasă sau în produșii secundari (Einsele, 1983).

S-a tras concluzia că un control atent al purității materiei prime de bază sau a procedurii de extracție cu solvent (în cazul folosirii motorinei) este esențial pentru a fi siguri de absența compușilor aromatici policiclici din biomasa proteică.

Produsele microbiene trebuie să corespundă recomandărilor I.U.PA.C. pentru standardele microbiologice ale proteinelor neconvenționale de uz zootehnic (tabelul 78).

Tabelul 78

Standarde microbiologice pentru proteine neconvenționale folosite în hrana animalelor
(recomandări I.U.P.A.C. — 1979)

Număr bacterii viabile (total bacterii aerobe)	per gram < 100 000
Mucegaiuri viabile	< 100
Enterobacteriaceae	< 10
Salmonella	< 1 per 50 g
Staphylococcus aureus	< 1
Total *Clostridii*	< 1 000
Clostridia perfringens	< 100
Streptococci	< 10 000

Experimentările efectuate pe loturi mari de animale prin încorporarea de doze importante de biomasă în rațiile alimentare au stabilit că proteinele de biosinteză au o valoare biologică ridicată, digestibilitatea de peste 90%, și sînt lipsite de toxicitate atît la obținere, cît și după depozitare în timp.

4.10. ASPECTE ECONOMICE

Factorii care influențează costurile de producție a biomasei din hidrocarburi sînt similari cu aceia din procesele pe alte substraturi (metanol, hidrați de carbon) și depind de microorganism, substrat, nutrienți și de condițiile de proces.

Calculele economice asupra costurilor proteinelor obținute prin biosinteză pe bază de hidrocarburi, alcooli sau alte substanțe, au dus la un preț de cost competitiv cu cel al proteinelor care provin din surse clasice.

Cînd se alege tipul de organism care urmează a fi folosit, aspectele importante care trebuie considerate se referă la viteza de creștere și randamentul de transformare a substratului, stabilitatea în cultivarea continuă, precum și la mărimea celulelor. Viteza specifică de creștere și coeficientul de transformare, caracteristicile microorganismului influențează productivitatea și nivelul de producție.

Substraturile folosite în prezent pentru producerea de biomasă microbiană pot fi împărțite în două grupe :

— substraturi care rezultă din combustibili fosili prelucrați în industria chimică sau petrochimică, cum sînt *n*-alcanii, metanolul, etanolul, metanul etc. ;

— substraturi de origine vegetală sau animală care deseori sînt considerate deșeuri, de exemplu : melasă, zer, amidon, extract de porumb și derivate proteice.

Recentele creșteri în costurile petrolului și nesiguranța disponibilităților de țiței și gaze naturale în țările O.P.E.C. au condus la creșterea interesului pentru substraturi din deșeuri.

Prețul substratului contribuie cu un procent de 20% la prețul total al procesului. În tabelul 79 este prezentată o comparație a conținutului de C din diferite substraturi.

Tabelul 79

Conținutul în carbon al diferitelor substraturi
(Einsele, 1983)

Substratul	Conținutul în carbon/gram substrat	Conținutul de C relativ în glucoză (%)
Glucoză și hidrați de carbon înrudiți	0,40	100
Metanol	0,38	95
Metan	0,75	188
Etanol	0,52	130
n-Alcani	0,85	213

Din tabel se observă că *n*-alcanii sînt substratul favorizat. Folosirea *n*-alcanilor pentru producerea de proteine este influențată de mai mulți factori. În primul rînd *n*-alcanii sînt produși ai industriei petrochimice și de aceea trebuie ținut cont de costurile care cresc rapid și de disponibilitatea redusă. În al doilea rînd, un substrat care este în mai mare măsură redus, așa cum

sînt n-alcanii, necesită o aerare foarte mare care să asigure necesarul crescut de oxigen pentru metabolismul oxidativ, influențînd astfel costurile procesului.

În toate procesele, în care se produce biomasă microbiană, se folosesc cantități substanțiale de apă pentru alcătuirea mediului de cultură. Necesitățile de apă pentru o capacitate de producție de 100 000 t/an de biomasă din drojdii pe n-alcani sînt estimate la 18,2 milioane m³. Recirculînd o parte din efluentul provenit de la separare, se poate micșora necesarul de apă de proces, respectiv costul ei (tabelul 80).

Tabelul 80

Comparație între costurile de fabricație a diferitelor procedee de obținere a proteinelor din drojdii pe hidrocarburi
(Litchfield, 1977)

Componența costului	Motorină British Petroleum	n-Alcanii purificați		
		British Petroleum	Gulf	Liquichimica
Sursa de C și energie	13	40	45–46	57,5
Nutrienți minerali și alte substanțe chimice	30	18	12–14	17,2
Utilități	25	18	12–14	18,3
Manoperă			16–44	3,8
Depozitare			—	—
Asigurări și taxe	32	24	—	—
Materiale și stocuri			—	3,2
Depreciere			17–25	—

Pentru produsele obținute din petrol, procentajul pe care-l reprezintă costul sursei de C și energie din costul total de fabricație a crescut drastic în ultimii ani. În plus, costurile sînt influențate de creșterile relative în prețurile azotatului, fosforului, energiei și manoperei în regiunile geografice unde sînt localizate fabricile producătoare de biomasă.

Prețurile de vînzare pentru diverși produși microbieni obținuți prin creșterea drojdiilor pe n-alcani sînt prezentate în tabelul 81. Aceste prețuri sînt

Tabelul 81

Compararea prețurilor de vînzare a diverselor produse proteine microbiene
(Litchfield, 1977)

Microorganismul	Conținutul proteic tipic (%, substanță uscată)		Domeniul de prețuri — US $/kg		
	Proteină brută (N×6,25)	Proteină reală	Calculat pe baza produsului	Calculat pe baza proteinei brute	Calculat pe baza proteinei reale
1	2	5	4	5	6
Candida lipolytica (n-alcani) uz animal	60	52	0,45	0,75	0,87
Candida lipolytica (motorină) uz animal	66	58	0,56	0,85	0,97

1	2	3	4	5	6
Drojdie de bere uscată uz animal	48	40	0,40–0,55	0,83–1,15	1,00–1,38
Saccharomyces cerevisiae (melasă) uz uman	52	45	0,99–1,01	1,90–1,94	2,20–2,24

exprimate în două moduri : pe baza cantității de produs obținute și pe baza conținutului în proteină brută și reală.

Proteina brută (N×6,25) este de obicei criteriul de bază în aprecierea hranei animale. Dar, pentru că celulele microbiene conțin cantități semnificative de azot neproteic, ca cel din acizii nucleici, valoarea obținută prin înmulțirea cu factorul 6,25 poate supraestima conținutul proteic exact al acestor produse. Proteina reală calculată prin analiză de aminoacizi poate fi o metodă mai sigură de apreciere a conținutului proteic al biomasei microbiene (Litchfield, 1977).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANGHEL I., TOMA N., VOICA C., COJOCARU I. *Biologia şi tehnologia drojdiilor.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1989.
2. ANGHELACHE I. *Obținerea proteinelor prin biosinteză din materii prime petrochimice.* Editura Ştiințifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1978.
3. BLANCH H. W., EINSELE A. În: Biotechnol, Bioengl 15, 1973, 861.
4. BOS P., and DE BRUYN J. C. În: Antonie vanLeeuwenhoek, 39, 1973, 99.
5. CHAMPAGNAT A., ADRIAN J. *Petrole et proteines,* sub red. DOIN, Paris, 1974.
6. DIMMLING W., and SAMBETH W. În: *„Einzeller-Proteine-Ihre Herstellung und Anwendung"*, Forum Mikrobiologie, Nr. 1, p. 9, S-I-T. Verlag, Darmstadt, 1981.
7. DUPPEL W., LEBEAULT J. M., COON M. I. În: Eur. I. Biochem., 36, 1973, 583.
8. EINSELE A., and FIECHTER A. În: Pathol. Microbiol., 34, 1969, 149.
9. EINSELE A., and FIECHTER A. În: Adv. Biochem. Eng. 1, 1971, 169.
10. EINSELE A., SCHNEIDER H., and FIECHTER A. În: J. Ferment., Technol., 53, 1975, 241.
11. EINSELE A., RISTROPH D. L., and HUMPHREY A. E. În: Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol. 6, 1979, 335.
12. EINSELE A. *Biomass from higher n-Alkanes, „Process Enginnering Departnent;"* Sandoz AG Basel, Switzerland, 1983.
13. EISENTHAL C. B. În: Biochem. J. 139, 1974, 715
14. ERICKSON L. E., PAN L. T., SHAN P. S., and CHEN M. S. K. În: Biotechnol. Bioeng. 12, 1970, 713.
15. ERMAKOVA I. T., and FINOSENOVA T. V. În: Mikrobiologiya, 40, 1971, 223.
16. FUKUI S., and TANAKA A. În: Adv. Biochem. Eng. 17, 1980, 1.
17. FUKUI S. and TANAKA A. În: Adv. Biochem. Eng. 19, 1981, 217.
18. GMÜNDER F. K. *Die Assimilation von Hexadecan durch Candida tropicalis,* Dissertation ETH Zürich, 1979.
19. HOERBURGER W. În: Forschungsbericht Wirtschafts-und Verkehrsministerium Nordrheim-Westfalen, 131, 1955, 2211.
20. HUMPHREY A. E. *Microbiol protein-from petroleum.* În: Process, Process. biochem., June, 1970, 19.
21. JUST F. and SCHNABEL W. În: Branntweinwirtschaft, 88, 1948, 113.

22. JUST F., SCHNABEL W., and ULLMANN S. În: Brauerei Wiss. Beil. 4, 1951, 57.
23. KANAZAWA M. *„The production of yeast from n-paraffins“*. În: „Single — Cell Protein H.“; sub red. S.R. TANNENBAUM, and D.J.C. WANS, p. 69 Mit. Press, Cambridge, Ma, 1976.
24. KÄPPELI O., and FIECHTER A. În: Biotechnol. Bioeng. 21, 1980, 1829.
25. KLUG M. J., and MARKOVETZ A. I. În: Adv. Microbiol. Physiol. 5, 1971, 1.
26. LANGMUIR I., CHEM, AM. J. Ind Soc. 40, 1918, 1361.
27. LEVI J. D., SHENNAN J, L., and EBBON G. P. *„Biomass from liquid n-alkanes“*. În: Economic Microbiology, vol. 4: Microbiol. Biomass. sub red. A. H. ROSSE, Academic Press., London, 1979.
28. LINEWEAVER H. and BURK D., CHEM AIM J. În: Soc. 56, 1934, 658.
29. LITCHFIELD, J. H. În: Adv. Appl. Microbiol. 22, 1977, 267.
30. LODDER J. *The yeasts, a A. Taxonomic Study*. sub red. J. LODDER, North-Holland, Amsterdam, 1970.
31. MAKAHARA T., ERICKSON L. E. În: Biotechnol. Bioeng., 19, 1977, 9.
32. MCKENNA, E. J., and KALLIO R. E. În: Annual Rev. Microbiol. 19, 1965, 183.
33. MEISSEL M. N., MEDVEDEVA, G A., and KOZLOVA T. N. În: Mikrobiology 45, 1976, 844.
34. MIMURA A., WATANEBE S., TAKEDA I. În: J. Ferment. Technol., 49, 1977, 255.
35. MIURA Y., OKAZAKI M. În: Biotechnol. Bioeng., 19, 1977, 701.
36. MIURA Y. În: Adv. Biochem. Eng., 9, 1978.
37. MIYOSHI, M. În: Jahrb. Wiss. Bot., 1895, 269.
38. MOO-YOUNG, M. *A survey of SCP production facilities*. Process Biochem. Dec., 1976, 32.
39. ONISCU C. *Tehnologia produselor de biosinteză*. Editura Tehnică, București, 1978.
40. PERRIER, A. În: Ann. Sci. Agron. Fr. Etrangl , 30, 1913, 321.
41. RATLEDGE C. În: „Developments in Biodegradation of. Hidrocarbons“; vol. I, sub red. R.J. WATKINSON, in Applied Science Publications, pp. 1—46, 1978.
42. REHM H. J., and REIFF I. În: Adv. Biochem. Eng. 19, 1981, 175.
43. SCHREIER K. În: Chem. Ztg., 99, 1975, 328.
44. SHENNAN J. L., and LEVI J. D. În: Prog. Ind. Microbiol. 13, 1974, 1.
45. VELANKAR S. K. În: Biotechnol. Bioeng., 17, 1975, 241.
46. ZOBELL C. E. În: Bacteriol Rev., 10, 1946, 1.
47. WICKERMAN L. J., KURTZMAN C. P., and HERMAN A. J. În: Science, 167, 1970, 1141.
48. WILLIAMS P. A. În: Developments in Biodegradation of Hydrocarbons vol. I, sub red. R.J. WATKINSON, in Applied Science Publishers, 1978, 135—164.
49. QUAYLE J. R. În: Biochemistry of Hydrocarbons, Symp of microbiol. London, Sept. 1967.

5. OBȚINEREA PROTEINELOR DIN METANOL CU AJUTORUL DROJDIILOR

MARIA CERCEL, A. VAMANU

5.1. INTRODUCERE

În ultimii ani asistăm la o nouă revoluție în biologie, denumită de specialiști „revoluția biotehnologică sau bioindustrială". Conceptul modern de biotehnologie este diferit fundamental de „biotehnologiile" convenționale. În noua accepțiune, biotehnologia, născută din interferența științelor biologice cu tehnologia, reprezintă un domeniu științific nou, bazat pe utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei, biologiei moleculare și ingineriei chimice pentru realizarea de aplicații tehnologice cu ajutorul sistemelor biologice (Zarnea, 1985).

Un obiectiv important al revoluției biotehnologice este acela de a sprijini rezolvarea celor două crize — alimentară și energetică — de altfel, strîns interdependente. Studii recente estimează că la sfîrșitul secolului actual deficitul proteic va fi mult mai mare decît în prezent.

Creșterea continuă a necesarului de proteine pentru om și animale precum și mărirea continuă a prețurilor au determinat dezvoltarea unor noi posibilități de obținere a proteinelor cu proprietăți superioare. În aceste condiții, se întrevede că acoperirea necesarului de proteine se va putea realiza atît prin dezvoltarea resurselor tradiționale bazate pe agricultură, zootehnie, piscicultură, cultura algelor, cît și prin dezvoltarea producției industriale de proteine bazată pe procese biochimice. Pentru cel din urmă caz se are în vedere atît existența unor materiale secundare și subproduse din agricultură și industrie (ape reziduale din industria alimentară și zootehnie, subproduse din sectorul de celuloză și hîrtie, ape de condens de la fabricarea unor îngrășăminte chimice, ape reziduale metanolice etc.), cît și disponibilitatea — în unele țări — a metanolului, etanolului, gazului metan și a derivatelor petroliere.

Obținerea prin biosinteză microbiologică a proteinelor, cunoscute în literatura de specialitate sub denumirea de „Single Cell Proteins" (SCP), prezintă o serie de avantaje:

— folosirea de materii prime accesibile cantitativ, calitativ și economic;

— valoarea nutritivă ridicată a biomasei realizate, comparabilă cu cea a proteinelor de origine animală;

— posibilitatea obținerii în flux continuu și în timp realativ scurt a unei producții mari, controlabile și independente de condițiile naturale;

— posibilitatea îmbunătățirii calității proteinelor prin lucrări de mutageneză și/sau inginerie genetică;

— prețul de cost accesibil.

Dintre materiile prime care s-au impus pînă în prezent ca substrat pentru cultivarea microorganismelor, metanolul continuă să se situeze pe primul loc, datorită avantajelor sale tehnologice și economice. Mai ieftin și mai disponibil decît alte materii prime, cu un domeniu de întrebuințări mai restrîns decît glucidele și etanolul, mai puțin periculos în manipulare decît metanul, perfect miscibil în mediul apos de cultivare, realizînd concentrate proteice lipsite de toxicitate, metanolul continuă să rămînă în atenția specialiștilor, evoluția în viitor a prețului acestuia fiind în conexiune cu posibila extindere a domeniului său în utilizare drept carburant.

În plus, pierderile de metanol prin evaporare sînt neglijabile, iar metanolul rezidual în aerul exhaustat este de asemenea neglijabil. Conținutul în aminoacizi al proteinelor obținute din metanol este mai mare decît al majorității proteinelor vegetale și este comparabil cu cel al proteinelor de origine animală.

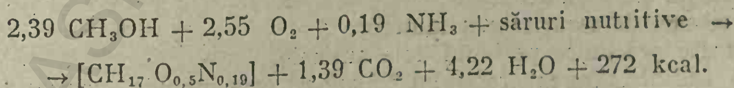
Pentru obținerea producției de proteine pe metanol există două posibilități: drojdii sau bacterii.

În cazul folosirii drojdiilor s-a plecat de la premisa că aceste microorganisme, folosite de foarte multă vreme în alimentația umană, trec mai ușor bariera psihologică reprezentată de neîncrederea cumpărătorilor față de acest tip de proteine. De asemenea, în cazul drojdiilor se remarcă faptul că acestea conțin vitamine, sînt mai rezistente la contaminarea cu germeni străini în condițiile unui pH acid, se pretează mai bine la asocierea cu alimente clasice, se pot separa mai ușor din masa rezultată din bioproces și au un conținut de acizi nucleici redus.

O problemă de actualitate care preocupă pe cercetători este aceea de a obține proteine de biosinteză texturate, care să imite carnea de bovine, păsări sau porcine. Alimentele texturate au în general calități gustative superioare alimentelor cu structură amorfă. Cele mai utilizate metode de texturare sînt cele bazate pe filare și extrudare termoplastică. Prin adăugare de condimente, arome, coloranți, alți compuși nutritivi, se pot obține produse texturate care să posede aroma și culoarea dorită (Anghelache, 1978).

În procesul de biosinteză a proteinelor, metanolul, amoniacul, oxigenul și sărurile nutritive sînt transformate în masă celulară, dioxid de carbon, apă și căldură. În condiții optime de creștere, producerea de compuși secundari din categoria substanțelor organice solubile este nesemnificativă, fiind practic neglijabilă.

Stoechiometria bioprocesului de obținere a proteinelor din metanol la *Hansenula polymorpha* ATCC 26012 (Müller, 1976) este următoarea:



$$2{,}39\ CH_3OH + 2{,}55\ O_2 + 0{,}19\ NH_3 + \text{săruri nutritive} \rightarrow$$

$$\rightarrow [CH_{17}O_{0,5}N_{0,19}] + 1{,}39\ CO_2 + 4{,}22\ H_2O + 272\ \text{kcal.}$$

Soluția nutritivă este sterilizată termic, iar metanolul, amoniacul și aerul prin filtrare.

Procedeul fiind continuu, rata de alimentare cu mediu proaspăt este egală cu rata de evacuare a biomasei.

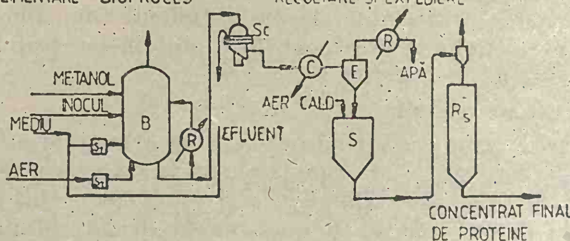


Fig. 130. Schema de principiu a instalaţiei de fabricare a proteinelor cu drojdii metilotrofe (după Champagnat, 1974) :

B — bioreactor ; *R* — răcitor ; *U* — uscător ; *S* — sterilizator ; *Sc* — separator ; *E* — evaporator ; *C* — schimbător de căldură ; *Rs* — siloz.

O parte din mediul epuizat în bioreactor este recirculat, fără a influenţa negativ procesul de biosinteză a proteinelor.

Prelucrarea mediului urmează următoarele etape : separare, plasmoliză, evaporare şi atomizare.

Produsul atomizat şi bine caracterizat poate fi administrat animalelor după o reţetă bine stabilită.

O schemă de flux tehnologic pentru obţinere de proteine din metanol cu drojdii este prezentată în fig. 130.

În dezvoltarea proceselor biotehnologice pentru obţinere de proteine din drojdii metilotrofe, principalele etape pot fi sumarizate astfel :

I) *Evaluarea şi optimizarea parametrilor biologici.* Desfăşurată la nivel de laborator şi pilot, aceasta include :

— izolarea şi identificarea drojdiilor metilotrofe ;
— studii de metabolism şi studii genetice ;
— îmbunătăţirea performanţelor economice ale tulpinilor de lucru ;
— îmbunătăţirea condiţiilor de cultivare ;
— conservarea potenţialului bioproductiv.

II) *Elaborarea procesului tehnologic.* La nivel pilot industrial, aceasta presupune :

— folosirea unui bioreactor adecvat ;
— optimizarea mediului de cultură ;
— folosirea parametrilor cinetici în elaborarea unui model matematic ;
— folosirea modelului matematic în optimizarea condiţiilor de cultivare în flux continuu ;
— prelucrarea mediului de cultură ;
— studii de inginerie chimică ;
— epurarea şi refolosirea apelor reziduale ;
— analize chimice pe flux şi analiza produsului finit ;
— calcul de economicitate ;
— măsuri de securitate a muncii.
— teste preclinice pe biomodele animale.

III) *Industrializarea procesului tehnologic* care include, printre altele :

— ridicarea la scară a procesului (scale-up) ;
— analiza produsului finit ;
— testări pe animale sub aspect farmacologic, mutagen, cancerigen, teratogen, de efect bioproductiv, digestibilitate, bilanţ al azotului etc. ;

— rezolvarea problemelor legate de amplasare, investiţii etc.

Pe scurt, tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată şi ptimizată în instalaţii pilot şi pilot industrial, avînd capacităţi mai mari. n această fază se aleg modalităţile cele mai potrivite pentru prelucrarea meiului de cultură şi obţinerea proteinelor la randamente superioare.

Cercetările sînt continuate apoi în instalaţii industriale experimentale, entru a se putea studia comportarea microorganismelor şi pentru a se stabili ilanţurile de materiale şi energetice. În această fază se stabilesc şi preţurile e cost orientative ale produsului.

Pe baza rezultatelor obţinute în instalaţiile industriale experimentale, e elaborează tehnologia industrială de producţie şi proiectul pentru contrucţia unităţii industriale (Faust, 1983).

Elaborarea unui proces industrial pentru obţinere de proteine necesită el puţin 10 ani de cercetare şi dezvoltare (Faust, 1983), incluzînd specialişti e diferite discipline cum ar fi: biologie, biochimie, medicină, farmacie, himie, inginerie chimică, proiectare.

5.2. TULPINILE FOLOSITE PENTRU OBŢINEREA PROTEINELOR DIN METANOL

Izolarea şi selecţia drojdiilor metilotrofe. Există un număr mare de rojdii capabile de a utiliza metanolul ca sursă de carbon şi energie. Cele mai eprezentative aparţin următoarelor genuri: *Criptococcus, Hansenula, Rhootorula, Torulopsis, Pichia.*

La obţinerea proteinelor din metanol, principala problemă este aceea e a selecţiona o tulpină capabilă de a transforma metanolul în proteină la andamente de interes industrial şi care să prezinte următoarele caracterisci: mediu nutritiv puţin pretenţios, randamente superioare în aminoacizi senţiali, valoare biologică ridicată, absenţa totală a toxicităţii, producţie abilă (Cercel, 1986, 1987; Vamanu, 1987). Condiţiile optime de izolare a rojdiilor consumatoare de metanol sînt sumarizate în tabelul 82.

Tabelul 82

Condiţiile optime de izolare a drojdiilor consumatoare de metanol
(după Sahm, 1977)

Factori care influenţează izolarea	Condiţii optime
I-ul mediului	4,5 (*p*H-ul optim pentru dezvoltarea drojdiilor metilotrofe este 4–5)
nestecul de vitamine	Este necesar, deoarece cele mai multe din drojdiile metilotrofe au nevoie de biotină (20 μg/l) şi/sau tiamină (1 mg/l)
oncentraţia de metanol	0,1–0,5% (*v/v*); la concentraţii de metanol mai mari de 0,5%, poate avea loc inhibiţia dezvoltării
ırsa de izolare	Locurile cu acumulare de metan, metanol. Substanţele organice conţinînd gruparea metil ca pectina din pulpa fructelor, petalelor sau florilor. Materiale lignocelulozice putrezite

Recoltarea probelor din natură. Probele de sol utilizate pot fi recoltate din zonele cu degajări de metan sau din zonele cu resturi vegetale în descompunere.

Însămînțarea probelor de sol în medii de îmbogățire lichide. Mediile de îmbogățire au în componența lor săruri de fosfor și amoniu, cantități mici de extract de porumb sau extract de drojdie ori malț, săruri minerale, oligoelemente, apă de robinet și metanol.

Metanolul se adaugă porționat, pentru o concentrație totală de 2—3% (*v/v*).

Pentru izolarea drojdiilor metilotrofe poate fi folosită următoarea formulă de mediu (Asthana, 1971):

KH_2PO_4	0,30 g
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,35 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,50 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,05 g
Extract de drojdie	0,01 g
Apă de robinet	100 ml
Metanol	1 ml
*p*H = 4,5—5	

Flacoanele conținînd mediu de îmbogățire sînt însămînțate cu probe din sol (0,5—1 g) și sînt aerate prin agitare timp de 4—5 zile la temperatura de 28. . .30°C sau 35°C. (În foarte rare cazuri, drojdiile se dezvoltă la temperaturi de peste 30°C). La diferite intervale de timp, pot fi prelevate probe pentru a se urmări evoluția culturii și a se izola drojdiile consumatoare de metanol.

După cum se poate vedea, în procesul de izolarea drojdiilor metilotrofe, atît prezența metanolului cît și *p*H-ul acid joacă rol de factori selectivi, întrucît elimină din competiție o mare parte din bacterii, în afara celor acido-tolerante sensibile la metanol. Prezența unor antibiotice, acolo unde nu se pot elimina bacteriile (de exemplu 10 μg tetraciclină la 100 ml mediu) joacă rol, de asemenea, de factori selectivi în izolarea drojdiilor în cultură pură (Asthana, 1971).

Izolarea drojdiilor în cultură pură. Pentru aceasta, cultura dezvoltată pe mediu lichid este însămînțată pe mediu solid, repartizat în plăci Petri. Compoziția mediului solid este asemănătoare cu cea a mediului lichid. Pentru solidificare, agarul este adăugat în proporție de 2—2,5g %. Metanolul (1—2%) este încorporat în mediu la aproximativ 50°C, înainte de turnarea în plăci a mediului.

Însămînțarea se poate face prin dispersie cu ansa sau bagheta de dispersie, atît din cultura nediluată cît și din cultura diluată corespunzător. Scopul principal al dispersiei este acela de a obține colonii izolate.

Incubarea plăcilor are loc în condiții corespunzătoare de temperatură pentru o durată variabilă de timp, de exemplu 2—7 zile.

Obținerea culturilor stoc. Coloniile izolate de drojdii sînt repicate cu ansa pe mediu solid repartizat în eprubete.

După incubare (48 ore la temperatură corespunzătoare), culturile sînt stocate la +4°C, în vederea testării capacității de bioconversie a metanolului la biomasă.

Testarea capacității de bioconversie a metanolului la biomasă. Testarea se efectuează în condiții de aerare prin agitare pe un mediu nutritiv lichid, care poate avea aceeași compoziție ca și mediul de izolare.

Se urmărește capacitatea de acumulare a biomasei într-un anumit interval de timp și la o concentrație dată de metanol.

Producția de biomasă se poate determina turbidimetric și/sau prin determinarea substanțelor uscate (a concentrațiilor celulare).

Selecționarea drojdiilor metilotrofe. Drojdiile metilotrofe cu rezultatele cele mai bune (acumulare mare de biomasă într-un interval redus de timp și la un consum specific mic de metanol) sînt reținute pentru testări ulterioare.

Stocarea culturilor selecționate. Pentru testări, stocarea culturilor selecționate devine obligatorie. Ea poate fi făcută la +4°C, pe mediu solid înclinat (cultură de întreținere) sau semisolid (sub ulei de parafină), în coloană dreaptă.

5.3. IDENTIFICAREA, TAXONOMIA ȘI CARACTERIZAREA DROJDIILOR METILOTROFE

5.3.1. IDENTIFICAREA DROJDIILOR METILOTROFE

Identificarea drojdiilor metilotrofe nu poate fi efectuată decît în cultură pură.

Pentru identificarea drojdiilor este folosit sistemul curent adoptat pe plan mondial (Lodder, 1970).

După Lodder, pentru identificarea drojdiilor sînt utilizate 4 clase principale de criterii.

Caracteristici morfologice:
- caracteristicile reproducerii vegetative;
- caracteristicile celulelor.

Caracteristici culturale:
- dezvoltarea în medii lichide;
- dezvoltarea pe medii solide.

Caracteristici sexuale:
- caracteristicile ascelor și ascosporilor;
- interfertilitatea la drojdiile ascomicete;
- caracteristicile teliosporilor și sporidiilor.

Caracteristici fiziologice:
- utilizarea compușilor cu carbon;
- utilizarea compușilor cu azot;
- dezvoltarea pe medii lipsite de vitamine;
- dezvoltarea pe medii la presiuni osmotice ridicate;
- dezvoltarea la temperaturi ridicate (37°C);
- producerea de acid;
- producerea de compuși amiloidici extracelulari;
- hidroliza ureei;
- hidroliza grăsimilor;
- formarea de pigment;
- producerea de ester;
- rezistența la celohexamidă;
- lichefierea gelatinei.

5.3.2. TAXONOMIA DROJDIILOR METILOTROFE

Cu toate că drojdiile consumatoare de metanol reprezintă un grup important de microorganisme utilizate pentru producția de biomasă, sistematica lor nu a fost studiată în detaliu (Anghel, 1984, 1987).

În 1980, Lee și Komagata au introdus în clasificarea drojdiilor metilotrofe, alături de criteriile descrise anterior, și criterii chemotaxonomice, pe care le-au aplicat atît la o serie de tulpini nou izolate în Japonia, cît și la tulpini de drojdii metilotrofe aparținînd unor colecții internaționale.

Criteriile chemotaxonomice introduse au fost următoarele:

— conținutul *GC* al ADN-ului;
— compoziția peretelui celular (spectrele *pmr* ale polizaharidelor);
— sistemele ubiquinonice;
— paternul electroforetic al metanol-oxidazelor.

Pe baza acestor criterii, drojdiile consumatoare de metanol au fost împărțite în 4 mari grupe. În tabelul 83 este prezentată gruparea drojdiilor consumatoare de metanol pe baza criteriilor chematoxonomice descrise.

Tabelul 83

Gruparea drojdiilor consumatoare de metanol pe baza unor caracteristici chemotaxonomice
(după Lee și Komagata, 1980)

Grupa	Specia	Conținut, GC%	Sist. obiquinonic	Spectrul *pmr*	Metanol-oxidaza
1	*Candida boidinii*	29,2—32,9	Q_7	18 p	Tip
2	*Candida succifila*	40,9	7	9-a	tip III
	Hansenula glucozyma	45,1	7	9-b	tip II
	henricii	49,7—50,2	7	9-b	tip II
	minuta	46,8—47,3	7	9-b	tip II
	nonfermentans	45,6	7	9-b	tip II
	polymorpha	47,8—48,3	7	9-b	tip II
	wickerhamii	45,4	7	9-b	tip II
	Pichia pinus	44,4	7	9-b	tip II
	Candida cariosilignicila	35,1	7	9-b	tip II
	Hansenula philodendra	49,7	7	9-b	tip I
	Pichia lindnerii	48,0	7	9-b	tip I
	Torulopsis metanolovescens	49,4	7	9-b	tip I
	pinus	37,3	7	9-b	tip I
	nitratofila	36,6	7	9-b	tip III
	Pichia trehalophila	34,6	7	9-c	tip II
	Torulopsis nemodendra	39,5	7	9-c	tip I
	Torulopsis sonorensis	36,1	7	6-f	tip I
3	*Pichia cellobiosa*	36,9	8,7	9-d	tip II
4	*Hansenula capsulata*	46,8—47,1	8	11-h	tip III
	Torulopsis molischiana	47,2	8	11-h	tip III
	Pichia pastoris	40,2—41,0	8	6-b	tip III

GC% reprezintă procentul de guanină + citozină.

5.3.3. CARACTERIZAREA DROJDIILOR METILOTROFE

Desigur, pînă la un anumit punct, caracterizarea drojdiilor metilotrofe se suprapune cu identificarea lor, mai precis, o serie întreagă de caracteristici ale drojdiilor metilotrofe reies chiar la efectuarea testelor de importanță primară (care permit clasificarea unei drojdii la nivel de gen, chiar specie) precum și a testelor de confirmare.

Pentru tulpinile de interes industrial, este necesară însă o caracterizare cît mai completă a lor, caracteristicile de producție ocupînd un loc important. Dintre caracteristicile de producție enumerăm :

— mărimea fazei *lag* ;

— *p*H-ul optim ;

— temperatura optimă ;

— randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă ;

— consumul specific de metanol ;

— rata specifică de creștere ;

— rata de diluție ;

— viteza transferului de oxigen ;

— coeficientul transferului de masă în funcție de diferiți parametri ;

— conținutul de proteine etc.

Deci, caracterizarea drojdiilor metilotrofe este impusă de exigențele elaborării unui proces tehnologic industrial și, legat de acesta, de exigențele efectuării lucrărilor de mutageneză și/sau inginerie genetică. La rîndul său, caracterizarea tulpinilor de lucru furnizează informațiile necesare stabilirii principalelor direcții de îmbunătățire a performanțelor economice a tulpinilor de drojdii metilotrofe prin mutageneză, prospectînd totodată posibilitățile de îmbunătățire a performanțelor lor prin tehnici de inginerie genetică.

La microorganismele metilotrofe interesează, de asemenea :

— calea de asimilare a metanolului, cunoscut fiind faptul că asimilarea metanolului pe calea ribulozo-monofosfat este cea mai eficientă din punct de vedere energetic (Zarnea, 1984) ; după Sahm (1977), drojdiile metilotrofe asimilează metanolul pe calea ribulozo-monofosfat ;

— calea de asimilare a amoniacului ; conversia amoniacului în glutamat cu ajutorul enzimei glutamat sintetaza este ineficientă din punct de vedere energetic ; comparativ, conversia cu glutamat-dehidrogenază este mai avantajoasă, motiv pentru care cercetătorii firmei I.C.I., aplicînd tehnologia ADN-ului recombinat, au reușit să construiască o nouă tulpină bacteriană care a primit gena glutamat-dehidrogenază în locul genei glutamat-sintetază ; în acest fel, randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă s-a îmbunătățit cu 5% (Tiedtke, 1978 ; Windass, 1980).

După Sahm (1977), din punct de vedere al capacității lor de a asimila metanolul ca unică sursă de carbon și energie, microorganismele metilotrofe pot fi :

— strict consumatoare de metanol, care cresc numai pe compuși C_1, cum ar fi : metanul, metanolul, metilamina ;

— facultativ consumatoare de metanol, care cresc și pe alte substraturi, cum ar fi glucoza sau succinatul.

Din acest punct de vedere, drojdiile metilotrofe utilizează facultativ metanolul (Sahm, 1977).

5.4. ÎMBUNĂTĂȚIREA PERFORMANȚELOR ECONOMICE ALE TULPINILOR DE DROJDII FOLOSITE ÎN OBȚINEREA DE PROTEINE DIN METANOL

Procedeul industrial de obținere de proteine din metanol cu drojdii trebuie să fie cît mai economic. În acest sens, un rol important revine tulpinii de lucru alese, care trebuie să întrunească concomitent mai multe calități cum ar fi: mediu nutritiv puțin pretențios, randamente superioare în aminoacizi esențiali, valoare biologică ridicată, absența totală a toxicității, producție stabilă.

În mod frecvent, apare necesitatea îmbunătățirii performanțelor economice ale tulpinii de lucru alese, prin diferite procedee.

Îmbunătățirea performanțelor economice ale tulpinilor de lucru nu poate fi concepută în absența unei cunoașteri cît mai aprofundate a microorganismului ales, a limitelor și posibilităților lui de exploatare. De aceea, programul genetic de îmbunătățire a performanțelor unei tulpini, în general, și a unei tulpini metilotrofe în special presupune, în primul rînd, cunoașterea microorganismului de lucru și, legat de acesta, stabilirea principalelor direcții de îmbunătățire a performanțelor lui prin mutageneză și/sau inginerie genetică

Procedeul de izolare de tulpini cu performanțe economice îmbunătățite prin selecție continuă. Selecția continuă poate da posibilitatea obținerii unor tulpini cu performanțe economice îmbunătățite, dar aceasta durează mult timp (Sherwood, 1981).

Îmbunătățirea performanțelor economice ale tulpinilor prin mutageneză. Devenită tradițională, mutageneza a oferit și poate oferi în continuare posibilitatea obținerii unor tulpini cu performanțe economice îmbunătățite, cu condiția existenței unui criteriu de selecție a mutantelor (Cercel, 1982, 1983). Dintre realizările mutagenezei la drojdiile metilotrofe menționăm:

Mutante defective în unele din enzimele implicate în oxidarea și asimilarea metanolului. Obținerea unor astfel de mutante a fost necesară pentru elucidarea unor probleme legate de metabolismul metanolului la drojdiile metilotrofe (Sahm, 1774; Titorenko, 1983; Alamyae, 1985).

Mutante rezistente la temperaturi ridicate. Este cunoscut faptul că, în industrie, multiplicarea microorganismelor presupune producerea de căldură peste temperatura optimă. Pentru termostatarea sistemului, este necesară folosirea apei de răcire. Răcirea apei necesită însă energie. Din acest punct de vedere, tulpinile mutante al căror optim de temperatură este de 37°C devin avantajoase, diferența dintre temperatura de cultivare și temperatura apei folosite la răcire devenind semnificativă. În plus, la temperaturi mari, bioprocesul de obținere a proteinelor este accelerat. Astfel, la temperaturi mari, *Torulopsis metanosorboza* ATCC 20361 are o rată specifică de creștere mai mare; de asemenea, randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă este mai bun (Abe, 1980).

Studiul efectuat de M i y a s a k e (1980) demonstrează că, prin cultivarea drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* A 354 A la temperatura de 37°C, sînt afectate atît morfologia celulelor, cît și proprietățile fizice ale suspensiei de drojdie. Astfel, rata de sedimentare a suspensiei de drojdie crește pînă la 25%, ceea ce atrage după sine reducerea prețului de cost al produsului.

Mutante care acumulează aminoacizi în mediul de cultură. Mutantele de *Hansenula polymorpha* obținute de T i t o r e n k o (1983 b) acumulează

pînă la 110 mg aminoacizi/l de mediu de cultură, în timp ce tipul sălbatic acumulează 5 mg/l. Mutantele obținute sînt rezistente la norvalină, un analog al valinei și leucinei, iar aminoacizii acumulați în mediu sînt : valina, leucina, izoleucina, aspartatul, asparagina, precum și un derivat de cisteină.

Îmbunătățirea performanțelor economice ale tulpinilor de drojdie prin inginerie genetică. Unul dintre factorii critici în alegerea unui microorganism convenabil pentru producerea de proteine este eficiența cu care acesta convertește substratul carbon în carbon celular. Astfel, motivul pentru care bacteria *Methylophylus methylotrophus* — obligat metilotrofă — a fost selecționată pentru procesul I.C.I. de obținere a proteinelor din metanol, a fost eficiența mare de bioconversie a metanolului. Cu toate acestea, cercetătorii firmei I.C.I. au identificat o potențială sursă de risipire a metanolului în modul de asimilare a amoniacului. Noua tulpină obținută prin inginerie genetică s-a dovedit capabilă să consume mai puțină energie, fiind totodată stabilă din punct de vedere genetic (Tiedtke, 1978 ; Windass, 1980 ; Sherwood, 1981). Pe baza acestei modificări, randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă a crescut cu 5%. Un cîștig de energie, oricît de mic, reprezintă, la scară industrială, o importantă economie. În acest fel, randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă se apropie de cel maxim posibil (Sasson, 1988).

Ținînd cont de faptul că bacteriile — ca obiect genetic— sînt mai simple și mai bine studiate decît drojdiile, aplicarea tehnologiei ADN-recombinant la bacterii nu a fost deloc întîmplătoare.

La drojdii, din 1978, cele mai multe cercetări au fost axate pe dezvoltarea de vectori potriviți pentru clonarea genelor eucariotelor. Acești vectori sînt formați aproape exclusiv din plasmide bacteriene purtătoare de markeri genetici de drojdie, de obicei, cu un echivalent la *E. coli*, pentru a permite amplificarea vectorului înainte de transformarea la drojdii. Acești vectori pot, de asemenea, să poarte fragmentul de ADN de 2 μm. Prezența ADN 2 μm — un ADN autonom circular închis, găsit la *Saccharomyces cerevisiae* — are un efect marcant asupra frecvenței de transformare și menținerii ulterioare a ADN-ului „străin“ în celulele acceptoare (Sherwood, 1981).

În 1985, L e d e b o e r a izolat atît gena structurală pentru metanol-oxidază cît și secvența de ADN care reglează activitatea acestei gene la *Hansenula polymorpha*. Rezultatele obținute au demonstrat că gena structurală pentru metanol-oxidază codifică o proteină alcătuită din 664 aminoacizi și conține secvențe care nu intervin, alături de secvențe implicate în inițierea și terminarea transcrierii.

La drojdiile de interes industrial, fuziunea de protoplaste a devenit, se știe, un instrument pentru manipularea genetică și selecție (Peberdy, 1980 ; Kikuchi, 1980). La drojdiile metilotrofe, fuziunea de protoplaste dintre *Hansenula polymorpha* ML-3 (o specie haploidă care utilizează metanolul pe medii conținînd biotină) și *Hansenula polymorpha* VRM-Y 1397 (o specie haploidă care sporulează, incapabilă de a utiliza metanolul) a dus la obținerea unui hibrid care sporulează și care utilizează metanolul pe medii conținînd un analog al biotinei (Savehenko, 1981).

Fuziunea de protoplaste dintre tulpini haploide și diploide de *Hansenula polymorpha* a dus la obținerea de hibrizi diploizi, triploizi și tetraploizi. Hibrizii diploizi s-au dovedit stabili în comparație cu hibrizii triploizi și tetraploizi. Instabilitatea hibrizilor triploizi și tetraploizi se datorește atît frecvenței crescute de formare spontană de markeri auxotrofi, cît și descreșterii conținutului de ADN/celulă, în cursul perioadei de stocare a hibrizilor Sevehenko, 1983).

Prin fuzionarea unei drojdii metilotrofe *(Hansenula polymorpha)* cu o drojdie nemetilotrofă *(Pichia augusta)* s-au obținut descendenți care, pe baza spectrului de asimilare a diferite surse de carbon (metanol, glicerol), au fost împărțiți în 3 grupe:

— descendenți cu activitate enzimatică glicerol-dehidrogenazică care asimilează metanol;

— descendenți cu activitate enzimatică glicerol-kinazică care asimilează glicerol;

— hibrizi cu genotip recombinant (4—13%) cu activitate enzimatică glicerol-kinazică și glicerol-dehidrogenazică.

Din punct de vedere morfologic, descendenții au fost împărțiți în două grupe;

— descendenți a căror temperatură optimă este 28°C; dintre aceștia: 30% au morfologie asemănătoare cu *Pichia* (celule mari, ovale, adesea în lanț); 70% au morfologie asemănătoare cu *Hansenula* (celule de mărime medie sau mică, ovale);

— descendenți a căror temperatură optimă este 37°C; aceștia au morfologia ambilor părinți: celulele au o mărime intermediară între cei doi părinți și sînt de formă aproape sferică (Abramova, 1986).

Nu sînt precizate, în nici unul din cazuri, performanțele realizate prin introducerea acestor hibrizi la nivel industrial.

După Fasella (1981), ingineria genetică ar putea interveni în procesul de obținere a proteinelor de către fiecare celulă în parte, nu numai îmbunătățind calitățile economice privind capacitatea de cultivare și productivitatea celulară, ci și obținînd proteine cu o compoziție optimă de aminoacizi (de exemplu, prin inserarea genelor corespunzătoare în celulă), iar în cazul cîtorva microorganisme, făcînd să crească raportul proteină acizi nucleici în produsul finit.

5.5. MENȚINEREA CAPACITĂȚII BIOPRODUCTIVE A TULPINILOR DE DROJDII CONSUMATOARE DE METANOL

Obținerea proteinelor din metanol cu ajutorul unei drojdii selecționate nu poate fi concepută decît în condiții de reproductibilitate a rezultatelor. Reproductibilitatea rezultatelor nu poate fi asigurată, printre altele, decît prin menținerea caracteristicilor morfo-fiziologice și de producție ale tulpinii alese.

Deoarece, pe de o parte, capacitatea bioproductivă trebuie menținută timp îndelungat, de ordinul anilor, iar, pe de altă parte, conservarea tulpinilor selecționate nu a putut fi încă verificată în timp, tulpina fiind nou izolată, este bine ca pentru menținerea capacități bioproductive a ei să se apeleze, pe cît posibil, la toate mijloacele de conservare cunoscute.

Pasajele succesive. Efectuate la interval de 3—4 săptămîni pe mediu de întreținere optim pentru tulpina aleasă, pasajele succesive pot menține caracteristicile morfo-fiziologice și bioproductive ale acesteia, o mare perioadă de timp (Beech, 1971).

Conservarea sub ulei de parafină. Mediul folosit pentru conservare poate fi mediul de întreținere al tulpinii conținînd agar 0,5% în loc de 2%. Repar-

tizarea mediului se face în coloană dreaptă de 6—7 cm înălţime, în tuburi de 18,5 cm lungime. După sterilizare, eprubetele se menţin drepte (nu se înclină).

Însămînţarea se face cu ansa, pe suprafaţa mediului. Incubarea durează 4 zile, la temperatura optimă. După incubare, peste cultură se adaugă ulei de parafină p.a. steril (sterilizare 1 oră la 180°C — căldură uscată) pentru a realiza 1,5—2 cm înălţime deasupra culturii. Eprubetele se menţin în frigider. La utilizare, se înlătură uleiul de parafină, iar cultura se trece obişnuit cu ansa pe mediu solid proaspăt preparat. Incubarea are loc la temperatura optimă. Dezvoltarea durează 48 ore (Beech, 1971).

Conservarea prin liofilizare. Pe parcursul anilor, în literatura de specialitate au existat reţineri în ceea ce priveşte conservarea prin liofilizare a capacităţii bioproductive a unei tulpini de drojdii de interes industrial (Beech, 1971). Recent, K u p l e t s k a y a (1987) raportează păstrarea timp de 25 ani a unei tulpini liofilizate de *Candida*, cu condiţia unui titru celular mare după liofilizare şi/sau a unei cantităţi sporite de suspensie per fiolă.

Conservarea prin liofilizare şi trecerea culturii liofilizate sub formă vegetativă comportă mai multe etape.

Verificarea materialului biologic care urmează a fi liofilizat se face sub următoarele aspecte :

— puritatea culturii care se determină atît prin observaţii microscopice cît şi prin analiza coloniilor izolate în placă, pe mediu solid ;

— testarea caracteristicilor bioproductive ale tulpinii care se efectuează pe un număr de colonii izolate ; se realizează în condiţii de aerare prin agitare ; cultura cu cele mai bune rezultate se selecţionează în vederea conservării.

Cultivarea materialului biologic în vederea liofilizării urmăreşte multiplicarea în condiţii optime a culturii selecţionate.

Pregătirea suspensiei de celule presupune :

— suspensionarea culturii în mediul protector ales pentru o densitate celulară cît mai mare (aproximativ $1 \cdot 10^{14}$ celule/ml) ;

— repartizarea culturii în fiole de liofilizare.

Congelarea suspensiei de celule se efectuează, de exemplu, la —76°C ; amestecul răcitor poate fi format din zăpadă carbonică şi alcool etilic.

Liofilizarea propriu-zisă presupune mai multe etape şi depinde de tipul de aparat folosit. Durata liofilizării la un aparat de tip Usifroid MS 12 este de aproximativ 5 ore. Închiderea fiolelor se execută sub vid. Fiolele liofilizate se menţin la +4°C (Cercel, 1981).

Verificarea culturii liofilizate urmăreşte :

— trecerea culturii liofilizate sub formă vegetativă ;

— determinarea viabilităţii prin tehnica citirii în plăci a numărului de celule/ml ;

— păstrarea capacităţii bioproductive ;

— păstrarea purităţii culturii.

Conservarea în azot lichid, la —196°C. Este cunoscut faptul că prin conservarea în azot lichid pierderile în viabilitate în procesul de congelare-decongelare sînt mai scăzute comparativ cu pierderile în viabilitate în procesul de congelare-uscare-rehidratare din cazul liofilizării.

Este cunoscut, de asemenea, că azotul lichid păstrează viabilitatea nemodificată timp nelimitat, în timp ce prin liofilizare are loc o scădere a viabilităţii, în timp. Prezentînd în plus avantajul folosirii suspensiei de celule direct în producţie, păstrarea în azot lichid este, la ora actuală, o metodă larg

utilizată pentru conservarea diferiţilor producători de substanţe biologic active (Cercel, 1984; Tsutsayeva, 1987).

Conservarea în azot lichid presupune, în primul rînd, un studiu al compoziţiei mediului protector, precum şi stabilirea timpilor de congelare-decongelare, în scopul obţinerii unui procent ridicat de viabilitate.

Test rapid pentru prezicerea stabilităţii în timp a liofilizatelor (test accelerat de degradare termică, test rapid de stocare, test de îmbătrînire). Pentru o largă serie de produse condiţionate sub formă uscată, susceptibile de denaturări sau scăderi de potenţial, necesitatea stabilirii unui termen de valabilitate în timp a determinat căutări de metode posibil de standardizat. Primele căutări şi primele sugestii de rezolvare au fost făcute pentru o serie de produse vitaminice.

În lucrările lui Garret (1955), parametrul care a oferit cea mai bună posibilitate de soluţionare a fost temperatura. Metoda sa demonstrează că activitatea însăşi sau logaritmul ei descresc linear cu timpul la o temperatură aleasă şi că diferite rate ale descreşterii activităţii obţinute la temperaturi diferite sînt condiţionate de aceste temperaturi şi se produc în concordanţă cu principiile fizico-chimice fundamentale.

De la aceste observaţii experimentale, s-a ajuns la concluzia că datele de expirare ale preparatelor vitaminice pot fi deduse prin studii de degradare termică de scurtă durată. Degradarea termică de scurtă durată a preparatelor enzimatice este comparabilă cu cea înregistrată cînd produsele sînt păstrate la temperatura camerei sau la frigider, timp îndelungat.

Începînd din 1968, Damjanovic, apoi Mitic (1974), manifestă o preocupare permanentă în acest sens. Aplicări la o serie de vaccinuri vin să demonstreze precizia şi eleganţa procedeului.

Sfera de aplicabilitate a acestui procedeu s-a lărgit tot mai mult, deducerea stabilităţii în timp efectuîndu-se pentru o gamă largă de produse biologice (Cercel, 1981 a, 1981 b). Rezultatele înregistrate demonstrează concordanţa valorilor obţinute experimental cu valorile prognozate. Recent (Kishelov, 1987), testul a fost aplicat pentru tulpini consumatoare de metanol.

Testul se efectuează pe un număr de 100—150 fiole şi constă în parcurgerea mai multor etape de lucru.

Expunerea fiolelor liofilizate la trei temperaturi de degradare termică se face pe băi de apă termostatate.

Temperaturile de degradare sînt alese astfel încît reciproca temperaturilor absolute să fie în progresie geometrică:

$$\left(\frac{2}{T_1 + 273}\right) = \left(\frac{1}{T_0 + 273}\right) + \left(\frac{1}{T_2 + 273}\right), \tag{269}$$

unde: T_0 este temperatura minimă de degradare termică (°C);
T_1 — temperatura medie de degradare termică (°C);
T_2 — temperatura maximă de degradare termică (°C).

Alegerea temperaturilor minime şi maxime de degradare se bazează pe date experimentale preliminare; ele sînt alese astfel încît scăderea cu un logaritm a titrului celular (numărul de celule/ml) să aibă loc într-un interval de timp convenabil. Temperatura medie se calculează după relaţia (269).

Un număr de 3—5 fiole sînt scoase din băi la intervalele de timp alese şi sînt răcite brusc; pentru fiecare fiolă expusă se practică determinarea viabilităţii, exprimată în $\log_{(10)}$ a numărului de celule/ml. Pentru fiecare fiolă expusă se folosesc diluţii zecimale, pentru o cît mai bună apreciere a viabilităţii.

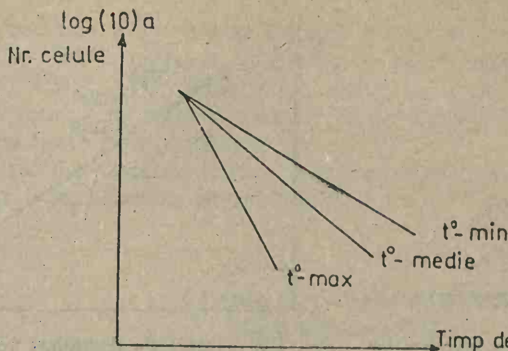


Fig. 131. Curbele de degradare termică a numărului de celule în relaţie cu tipul de expunere.

Pe baza rezultatelor expunerii fiolelor la cele 3 temperaturi alese, se pot trasa curbele de degradare termică, conform fig. 131.

Aşa după cum reiese din fig. 131, moartea termică a celulelor liofilizate este logaritmică ; ea a fost asimilată cu o reacţie chimică, descrisă prin ecuaţia :

$$\frac{dy}{dt} = Ky, \tag{270}$$

unde : y este concentraţia celulelor (nr. celule/ml) ; t, timp (min) ; k, constanta de degradare termică (rata de inactivare, rata de degradare).

Potrivit ecuaţiei (270) viteza de reacţie (de degradare termică) este funcţie de timp (t) şi de concentraţia substanţei care se degradează (y) şi este constantă (K) :

$$v = f(y, t). \tag{271}$$

Aflarea constantelor de degradare termică corespunzătoare celor 3 temperaturi alese se face prin prelucrarea statistică a datelor, folosind „Metoda celor mai mici pătrate". Constanta de degradare termică se calculează după formula :

$$K = \frac{\Sigma(ty) - \dfrac{(\Sigma t) \times (\Sigma y)}{n}}{\Sigma t^2 - \left(\dfrac{\Sigma t^2}{n}\right)}, \tag{272}$$

unde : n este numărul de determinări.

Între constanta de degradare termică şi temperatura absolută există relaţia lui Arrhenius :

$$K = A \cdot e\left(\frac{-E}{RT}\right) \tag{273}$$

unde : A este constanta de reacţie ;
e — baza logaritmului natural ;
E — energia de activare ;
R — constanta gazelor perfecte ;
$T°$ — temperatura absolută = $t° + 273$.

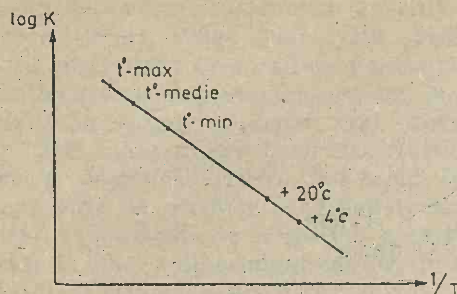


Fig. 132. Curba lui Arrhenius a logaritmilor constantelor de degradare termică față de reciprocele temperaturilor absolute.

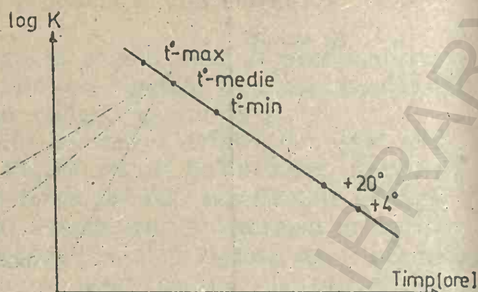


Fig. 133. Timpii de degradare termică pentru temperaturile de stocare.

Ecuația 273 se folosește în forma logaritmică :

$$\log K = \log A - \frac{E}{RT \cdot 2{,}303}. \tag{274}$$

Rezultă că logaritmul constantei este direct proporțional cu inversul temperaturii absolute, adică :

$$\log K = f\left(\frac{1}{T}\right). \tag{275}$$

Determinarea constantei de inactivare pentru orice temperatură. Reprezentînd grafic log K în funcție de inversul temperaturii absolute, se obține o dreaptă care, prin extrapolare, permite determinarea constantei de inactivare pentru orice temperatură (fig. 132).

Aproximarea timpilor de degradare termică pentru temperaturile de stocare. Reprezentarea grafică a tuturor constantelor de degradare termică pentru toate cele 5 temperaturi în raport cu timpul necesar scăderii cu un ordin de mărime a numărului de celule pentru cele 3 temperaturi alese, permite aproximarea timpilor de degradare termică pentru temperaturile de stocare, adică, stabilitatea în timp a liofilizatelor (fig. 133).

Determinarea numărului de celule viabile din liofilizate după parcurgerea unui anumit timp are loc după relația :

$$\log y = \log y_0 - Kt, \tag{276}$$

obținută prin integrarea ecuației (270).

5.6. ASPECTE ALE BIOPROCESULUI DE OBȚINERE A PROTEINELOR DIN METANOL

Mediile de cultură folosite pentru obținerea de proteine din metanol cu drojdii. Multiplicarea drojdiilor care folosesc metanolul ca unică sursă de carbon și energie presupune, în afară de carbon, hidrogen și oxigen — elemente furnizate de substrat și aer — și elemente minerale nutritive, microelemente și factori de creștere care, dizolvate în apă, constituie mediul nutritiv.

Ca substanțe nutritive se folosesc compuși minerali sau organici de tipul: sulfat, fosfat, clorură, conținînd cationi (NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Fe^{2+} etc.), anioni (Cl^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, NO_3^- etc.), amoniac, uree, o serie de microelemente sub forma ionilor de cupru, mangan, zinc, cobalt, molibden, bor, precum și vitamine și factori de creștere.

Principalele săruri nutritive utilizate curent în cultivarea drojdiilor metilotrofe sînt menționate în tabelul 84.

Tabelul 84

Compoziția mediului de cultură
(după Minami, 1978 b)

Compoziția	Catitatea
$(NH_4)_2SO_4$	4,00 g‰
KH_2PO_4	2,00
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,50
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,05
Extract de drojdie	0,50
Soluție de vitamine	0,10 ml‰
Metanol	2–3 g%

În urma analizelor efectuate, A i b a (1973) a arătat că macro și microelementele asimilate de către drojdiile metilotrofe din mediile de cultură sînt regăsite în compoziția chimică a acestora (tabelul 85).

Tabelul 85

Concentrația elementelor nutritive la drojdiile metilotrofe
(după Aiba, 1973)

Elementul	Concentrația % din substanța uscată
N	0,8–2,6
S	0,01–0,24
P	1–4,0
Mg	0,1–0,5
Na	0,01–0,1
Co	0,1–0,3
Fe	0,01–0,5
Cu	0,002–0,01
Mn	0,0005–0,007

Prezența microelementelor este esențială în multiplicarea drojdiilor metilotrofe, acestea influențînd randamentul, rata specifică de creștere precum și densitatea masei celulare. În ceea ce privește influența diferiților factori de creștere asupra dezvoltării drojdiei metilotrofe *Candida boidinii*, S a h m și W a g n e r (1971) au arătat că există o proporționalitate directă între con-

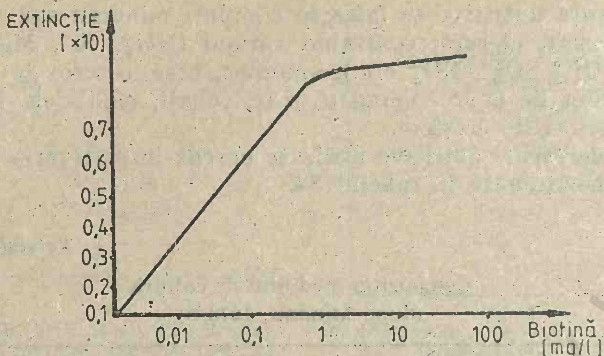


Fig. 134. Dependența creșterii *Candidei boidinii* de diferite concentrații de biotină (după Sahm și Wagner, 1972).

centrația biotinei și numărul de celule obținute pe unitatea de volum (fig. 134).

Schema preparării mediului de cultură în condiții semiindustriale și industriale este prezentată în fig. 135.

După consumarea elementelor nutritive din mediul de cultură dată de multiplicarea celulelor, acesta poate fi recirculat de la unitatea de separare a biomasei, la treapta de cultivare. Acest procedeu se folosește de obicei pentru a reduce consumul de apă și de materii prime. În aceste condiții, analiza efluentului devine obligatorie, atît pentru stabilirea consumurilor specifice de materii prime cît și pentru completarea concentrațiilor optime de săruri minerale.

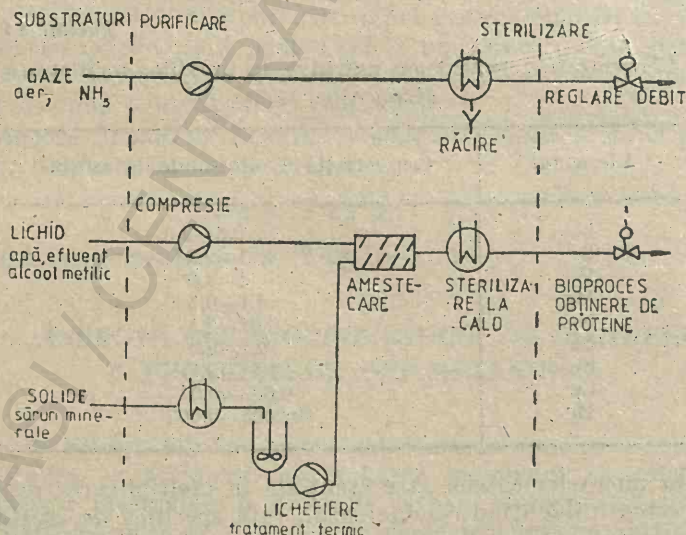


Fig. 135. Schema preparării mediului de cultură în condiții semiindustriale și industriale (după Faust, 1983).

5.7. BIOCHIMIA OXIDĂRII METANOLULUI LA DROJDIILE METILOTROFE

Un factor critic în găsirea unui microorganism convenabil pentru producerea de proteine este eficienţa cu care acesta converteşte substratul carbon în carbon celular. Aceasta poate fi stabilită, printre altele, prin elucidarea căilor metabolice de asimilare a metanolului.

Pentru necesităţile practicii, problema care se pune este aceea a determinării activităţii unui număr restrîns de enzime, care însă să furnizeze maximum de informaţii. Enzimele respective trebuie să catalizeze reacţii cheie în căile metabolice specifice tulpinii date.

5.7.1. OXIDAREA METANOLULUI

5.7.1.1. OXIDAREA METANOLULUI LA FORMALDEHIDĂ

Studiile efectuate asupra drojdiilor metilotrofe (Pilat, 1975 ; Topiwala, 1975 ; Sahm, 1977 ; Yamada, 1980 ; Sibirny, 1987) Lirova, 1987 ; Ilchenko, 1987 ; Nikolaev, 1987 ; Bayer, 1987) au arătat că primul intermediar în oxidarea secvenţială a metanolului este formaldehida. Enzima care catalizează această reacţie este o alcool-oxidază. Ea foloseşte deci oxigenul molecular ca acceptor de electroni. Aceasta explică de ce toate microorganismele care oxidează metanolul sînt strict aerobe.

Reacţia poate fi descrisă prin următoarea ecuaţie :



$$CH_3OH + O_2 \rightarrow HCHO + H_2O_2$$

Studiile efectuate asupra specificităţii de substrat au arătat că alcool-oxidaza nu este specifică pentru metanol. Ea este activă pentru etanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propen-1-01, 2-buten-1-01, 2-clor-etanol, 2-brometanol şi formaldehidă ; este inactivă pentru alcool cu lungimi ale catenei alchil mai mari de 5 atomi de carbon, alcooli secundari şi terţiari şi alcooli aromatici.

Valorile constantei Michaelis (Km) indică faptul că metanolul este cel mai bun substrat pentru enzimă ; afinitatea alcool-oxidazei pentru alcooli descreşte o dată cu creşterea lungimii catenei alchil.

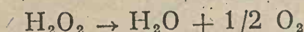
Enzima a fost extrasă, purificată şi caracterizată la un mare număr de drojdii metilotrofe (Sahm, 1977).

Spectrul de absorbţie în vizibil al enzimei native (avînd două pick-uri la 460 mm şi 375 mm) a sugerat posibila contribuţie a unui derivat flavinic la enzimă, ca grup prostetic. Această flavină a fost identificată ca FAD, legat necovalent la proteina-enzimă.

Greutatea moleculară a enzimei este de 600 000—670 000. Enzima este compusă din 8 subunităţi identice, avînd o greutate moleculară de 74 000—83 000 fiecare. Ea conţine 8 moli de FAD pentru 1 mol de enzimă.

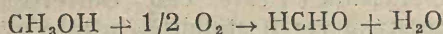
Rolul acestei enzime în oxidarea metanolului poate fi bine evidenţiat prin izolarea unei mutante căreia îi lipseşte alcool-oxidaza. Mutanta este incapabilă de a oxida sau a creşte pe metanol (Sahm, 1974). Activitatea enzimei este foarte scăzută sau nedetectabilă la drojdiile care cresc pe glucoză, etanol sau glicerol. În cursul adaptării de la glucoză la metanol, activitatea enzimei creşte înainte ca dezvoltarea pe metanol să înceapă. Enzima se formează deci inductibil, în prezenţa metanolului.

In vivo, alcool-oxidaza este asociată cu catalaza care descompune peroxidul de hidrogen format:



$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2\ O_2$$

Reacţia globală poate fi scrisă:



$$CH_3OH + 1/2\ O_2 \rightarrow HCHO + H_2O$$

Activitatea catalazică apare deci indispensabilă pentru degradarea compusului toxic format.

La celulele crescute pe metanol şi aflate în fază staţionară, activitatea catalazică este de 5 ori mai mare decît la celulele crescute pe glucoză sau etanol. La celulele aflate în fază exponenţială, activitatea catalazică este mult mai mare comparativ cu celulele aflate în fază staţionară. După transferul celulelor crescute pe glucoză pe mediu cu metanol, activitatea catalazică creşte foarte rapid în primele 5 ore. Ca şi alcool-oxidaza, catalaza se formează deci inductibil. Studiile efectuate au arătat că însuşi metanolul şi nu peroxidul de hidrogen acţionează ca inductor (Sahm, 1974, 1976).

Deci, la drojdiile metilotrofe, oxidarea metanolului la formaldehidă are loc prin două reacţii:

— prima este pe calea unei alcool-oxidaze care cere oxigen şi produce peroxid de hidrogen alături de formaldehidă;

— a doua este acţiunea peroxidativă a catalazei care foloseşte peroxidul de hidrogen generat de alcool-oxidază. Aceasta înseamnă că oxidarea metanolului la formaldehidă este diferită la drojdiile metilotrofe faţă de bacteriile metilotrofe. Principalele diferenţe sumarizate de Sahm (1977) sînt prezentate în tabelul 86.

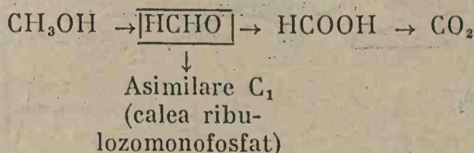
Tabelul 86

Comparaţie între proprietăţile metanol-dehidrogenazei bacteriilor metilotrofe şi alcool-oxidazei drojdiilor metilotrofe
(după Sahm, 1977)

Caracteristici	Metanol-dehidrogenaza la bacterii metilotrofe	Alcool-oxidaza la drojdii metilotrofe
Grup prostetic	Pteridina	FAD
Activare	NH_4^+, metilamina	—
Greutate moleculară	120 000—140 000 (două subunităţi)	600 000—670 000 (opt subunităţi)
λ_{max}	280—350 nm	280, 375, 460 nm
Km CH_3OH	0,02 mM	0,2—2 mM
Substrat	Alcooli alifatici primari pînă la o lungime a catenei de C_{16}, formaldehidă şi acetaldehidă	Alcooli alifatici primari pînă la o lungime a catenei de C_5, formaldehidă

În metabolismul drojdiilor metilotrofe, formaldehida ocupă o poziţie centrală, deoarece, la nivelul său, metabolismul anabolic se desparte de cel energetic: substratul C_1 poate fi utilizat pentru oxidare completă la dioxid

de carbon cu producerea energiei necesare pentru creştere, sau poate fi asimilat ca biomasă celulară :



$$CH_3OH \rightarrow \boxed{HCHO} \rightarrow HCOOH \rightarrow CO_2$$

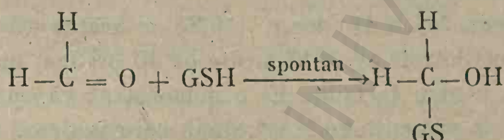
Alcool-oxidaza, enzima cheie a drojdiilor metilotrofe, orientează reacţiile atît spre dezasimilaţie cît şi spre asimilaţie (Sahm, 1977).

5.7.1.2. OXIDAREA FORMALDEHIDEI LA FORMIAT

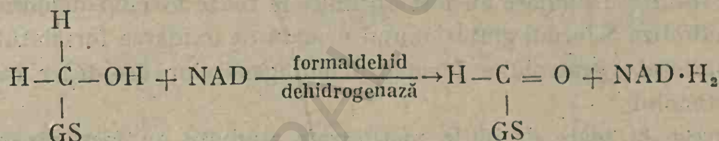
La toate drojdiile metilotrofe studiate, oxidarea formaldehidei la formiat are loc sub acţiunea enzimei formaldehid-dehidrogenază dependentă de NAD şi care necesită glutation (GSH). Enzima este indusă de metanol sau formaldehidă şi este represată de glucoză sau etanol.

Greutatea moleculară a enzimei purificate este de 80 000. Enzima este compusă din două subunităţi identice, avînd o greutate moleculară de 40 000 fiecare.

Produsul de oxidare este S-formil glutationul :

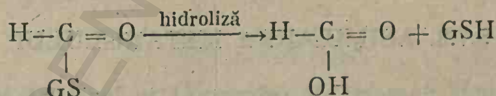


$$H-\overset{H}{\overset{|}{C}}=O + GSH \xrightarrow{spontan} H-\overset{H}{\overset{|}{\underset{GS}{\underset{|}{C}}}}-OH$$



$$H-\overset{H}{\overset{|}{\underset{GS}{\underset{|}{C}}}}-OH + NAD \xrightarrow[dehidrogenază]{formaldehid} H-\underset{GS}{\underset{|}{C}}=O + NAD \cdot H_2$$

S-formil glutationul poate fi hidrolizat enzimatic (sub acţiunea unei hidrolaze) sau neenzimatic la formiat şi glutation :



$$H-\underset{GS}{\underset{|}{C}}=O \xrightarrow{hidroliză} H-\underset{OH}{\underset{|}{C}}=O + GSH$$

Reacţia globală poate fi :



$$HCHO + NAD + H_2O \xrightarrow{GSH} HCOOH + NAD\ H_2$$

Recent (Sahm, 1977) s-a găsit că, la drojdiile metilotrofe, formaldehida poate fi oxidată la formiat sub acţiunea enzimei alcool-oxidaza, după reacţia :



$$HCHO + O_2 + H_2O \rightarrow HCOOH + H_2O_2$$

Oxidarea formiatului la CO_2 Reacţia are loc sub acţiunea enzimei formiat-dihidrogeneză dependentă de NAD:



$$HCOOH + NAD \rightarrow CO_2 + NAD\ H_2$$

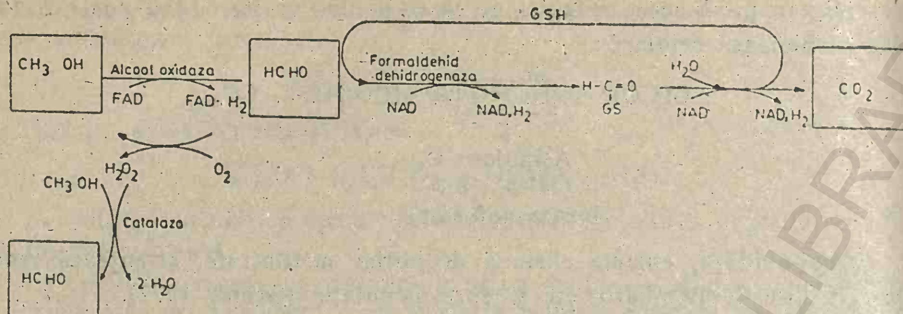


Fig. 136. Calea de oxidare a metanolului la drojdiile metilotrofe (după Sahm, 1977).

Greutatea moleculară a enzimei este de 74 000. După disocierea în subunități, s-a estimat că greutatea moleculară a catenei polipeptidice este de 36 000. Deoarece aceasta este aproximativ jumătate din valoarea găsită în condiții native, pare că formiat-dehidrogenaza drojdiilor metilotrofe este un dimer, compus din 2 subunități identice.

Constantele Michaelis (*Km*) au fost găsite a fi de 13 mM pentru formiat și de 0,09 mM pentru NAD.

Destul de recent, Van Dijken (1976) a arătat că formiat-dehidrogenaza drojdiilor metilotrofe are o afinitate de 40 ori mai mare pentru S-formilglutation decît pentru formiat. El a demonstrat că enzima hidrolizează S-formilglutationul în prezență de NAD, după care oxidează formiatul la CO_2. Deoarece rezultate similare au fost obținute la toate formiat-dehidrogenazele testate, hidroliza S-formil glutationului urmată de oxidarea formiatului apare ca o proprietate generală a formiat-dehidrogenazelor drojdiilor care utilizează metanolul.

Deoarece la toate drojdiile metilotrofe studiate au fost găsite enzime similare responasbile de oxidarea metanolului, se poate aprecia că drojdiile metilotrofe oxidează metanolul pe calea indicată în fig. 136.

5.7.2. ASIMILAREA METANOLULUI

Un aspect chimic deosebit de important în legătură cu drojdiile consumatoare de metanol este felul în care acestea asimilează atomul de carbon al metanolului, în vederea utilizării exclusive a acestuia în sinteza tututor compușilor cu carbon de care are nevoie. Datele actuale arată că, indiferent de tulpină, drojdiile consumatoare de metanol asimilează formaldehida pe calea ribulozo-5-fosfatului (ciclul Quayle).

După Quayle (1978), calea ribulozo-monofosfat evoluează în trei faze succesive (fig. 137).

În *faza de fixare* are loc condensarea a 3 molecule de formaldehidă cu 3 molecule de ribulozo-5-fosfat. Reacția este catalizată de enzima cheie a ciclului, hexozofosfat-sintetaza, a cărei coenzimă este tiamin pirofosfatul

Fig. 137. Ciclul ribulozomonofosfatului (*RuMP*) (după Quayle, 1978):
RuMP — ribulozomonofosfat; *HuMP* — hexulozo-6-fosfat; *FMP* — fructozo-6-fosfat; *APG* — aldehidă-3-fosfoglicerică; *DHAP* — dehidroxiacetonfosfat; *EMP* — eritrozo-4-fosfat; *SDP* — sedoneptulozodifosfat; *SMP* — sedoheptulozo-7-fosfat; *RiMP* — ribozo-5-fosfat; *XuMP* — xilulozo-5-fosfat.

TPP). Se formează 3 molecule de hexulozo-6-fosfat care, sub acţiunea hexulozo-fosfat-izomerazei, se epimerizează la fructoză-5 fosfat:

$$
HCHO + \begin{array}{l} C-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ CH_2-O-PO_3H_2 \\ | \\ \\ \text{Ribulozo-5-P} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ C=O \\ | \\ HC-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ CH_2-OşPO_3H_2 \\ \text{Hexulozo-6-P} \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ C=O \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ HC-OH \\ | \\ HC-OH \\ | \\ CH_2-O-PO_3H_2 \\ \text{Fructozo-6-P} \end{array}
$$

În *faza de clivare* are loc scindarea unei molecule de fructozo-6-fosfat şi producerea a doi compuşi noi: gliceroaldehid-fosfatul, necesar reacţiilor din faza a treia şi dihidroxiacetonofosfatul, care poate fi considerat produsul primar net al ciclului, deoarece poate fi utilizat în scop biosintetic.

Faza a treia, *faza de regenerare*, conţine ansamblul reacţiilor necesare pentru regenerarea a 3 molecule de ribulozo-5-fosfat pornind de la două molecule de fructoză-6-fosfat, necesare pentru închiderea ciclului şi asigurarea în continuare a reacţiilor de condensare cu formaldehida.

Ciclul ribulozo-monofosfat are ca rezultat sinteza de triozofosfat sau piruvat, pornind de la 3 molecule de formaldehidă, aşa cum reiese din fig. 138. Dacă triozofosfatul este reciclat, el asigură sinteza de tetroze, pentoze şi hexozofosfaţi, furnizînd astfel diferite *schelete* de carbohidraţi necesare pentru

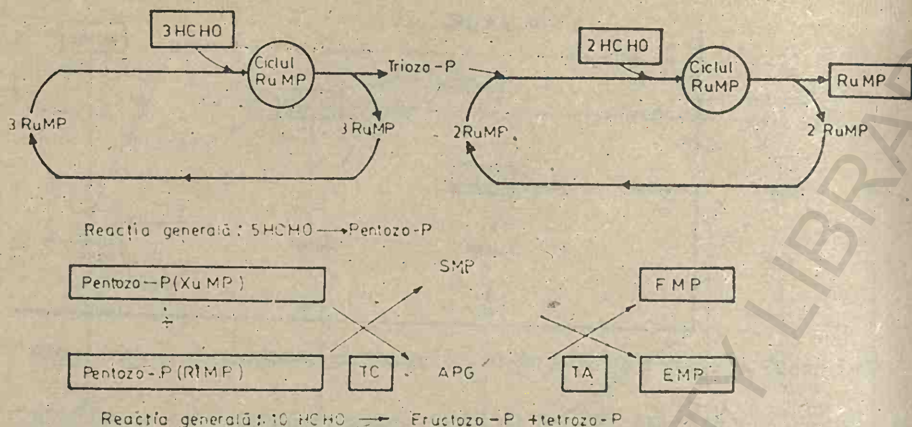


Fig. 138. Reacțiile care asigură sinteza de tetroze, pentoze și hexoze în ciclul ribulozomonofosfatului :
TC — transcetoloza ; *TA* — transaldoloza (după Quayle, 1979).

sinteza pereților celulari, a aminoacizilor aromatici, acizilor nucleici și polizaharidelor, fără ca să necesite participarea unor enzime adiționale față de cele implicate în ciclul Quayle.

5.8. CINETICA PROCESULUI DE OBȚINERE A PROTEINELOR ÎN SISTEM DISCONTINUU ȘI CONTINUU

Studiul cinetic al procesului de biosinteză a proteinelor pe bază de metanol a preocupat și preocupă un mare număr de cercetători (Hill, 1974 ; Minami, 1978 ; Miron, 1987). Performanțele cinetice ale tulpinii determină forma instalației industriale și, deci, investiția necesară.

Parametrii cinetici sînt utilizați în elaborarea unui model matematic pentru calculul corelațiilor fundamentale de obținere a proteinelor din metanol.

La rîndul lui, modelul matematic este folosit în otpimizarea condițiilor de cultivare în flux continuu.

5.8.1. PARAMETRII CINETICI

O caracteristică a bioprocesului constă în transformarea substratului metanol în formaldehidă și formiat care au ca rezultat multiplicarea microorganismelor.

5.8.1.1. CINETICA PROCESULUI ÎN SISTEM DISCONTINUU

În condiții ideale de multiplicare (în faza exponențială) cantitatea de masă celulară crește în funcție de timp după o progresie geometrică, adică se multiplică printr-un factor constant la fiecare unitate de timp. Creșterea biomasei $X(t)$ este descrisă de o ecuație de forma :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (277)$$

unde : t este timpul de bioconversie a metanolului la biomasă (h) ;
X — concentraţia celulară (substanţa uscată, biomasa, DCW, dry cell weight) ($g \cdot l^{-1}$) ;
μ — rata specifică de creştere celulară (rata de multiplicare, viteza de multiplicare, coeficient de creştere) (h^{-1}) ;

Ecuaţia (277) se poate scrie şi sub forma :

$$\frac{dx}{x} = \mu \, dt. \tag{278}$$

Prin integrarea într-un interval de timp discret $t_1 \ldots t_f$, ecuaţia (278) devine :

$$\ln X_f - \ln X_i = \mu(t_f - t_i) \tag{279}$$

de unde :

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i}. \tag{280}$$

Se calculează valoarea lui μ din ecuaţia (280) pentru fiecare interval de timp dintre două probe ale unei cultivări.

Pe parcursul procesului de biosinteză proteică, rata specifică de creştere celulară se modifică. Valoarea maximă găsită reprezintă rata specifică de creştere maximă (μC) pentru cultivarea respectivă.

Pentru determinarea statistică a ratei specifice de creştere celulară se utilizează valorile obţinute pe un număr cît mai mare de experimentări efectuate la diferite nivele de capacitate.

Timpul de dublare a concentraţiei de celule (T_D) poate fi calculat după formula :

$$T_D = \frac{dt \cdot X \cdot \ln 2}{dx} \tag{281}$$

$$\text{adică, } T_D = \frac{\ln 2}{\mu}. \tag{282}$$

După Anghelache (1978), timpul de dublare a concentraţiei de celule este de ordinul :

— minutelor, în cazul organismelor unicelulare ;
— zilelor, în cazul plantelor bogate în proteine ;
— săptămînilor, în cazul păsărilor şi animalelor.

Într-un bioproces de obţinere a proteinelor, randamentele celulare faţă de substratul metanol depind, în mare măsură, de concentraţiile de metanol la care sînt supuse celulele pe parcursul cultivării, atît excesul de metanol cît şi lipsa acestuia din mediu ducînd la randamente scăzute de bioconversie a acestuia la biomasă. De aceea, în cazul modelelor de creştere a populaţiilor de celule, ca variabile dinamice se folosesc, alături de concentraţiile celulare (ca elemente de măsură a ratei de multiplicare), şi concentraţiile substratului metanol. Cu alte cuvinte, rata specifică de creştere celulară depinde de concentraţia substratului limitativ :

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \tag{283}$$

unde : S este concentraţia metanolului (g %) ;
K_s — constanta de saturare.

Pe lîngă K_s ce reprezintă cea mai mică concentrație a substratului la care rata specifică de creștere este egală cu 1/2 din rata maximă specifică în absența inhibiției, trebuie introdusă și constanta de inhibiție (K_i) ce reprezintă concentrația cea mai mare a substratului la care rata specifică de creștere este egală cu 1/2 din rata maximă specifică în absența inhibiției. Din acest punct de vedere, relația (283) trebuie astfel transformată încît să exprime și să comensureze inhibiția prin substrat:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + \frac{S_2}{K_i}}. \qquad (284)$$

Există mai multe mecanisme posibile prin care o substanță realizează acțiunea sa inhibitoare:

— reacție chimică cu unul sau mai multe componente celulare;
— absorbție sau complexare cu enzimă, coenzimă sau alt substrat;
— intrarea inhibitorului în secvența normală de reacție;
— disocierea unor agregate enzimatice;
— modificarea variabilelor fizico-chimice ale mediului extern: pH, tărie ionică, constantă dielectrică, efect de solvent;
— complexare sau alte interacțiuni cu componentele celulare cu funcție de control.

Ținînd cont de marea diversitate a mecanismelor de inhibiție precum și de faptul că o inhibiție se poate realiza concomitent prin mai multe mecanisme, diferiți autori au propus o serie de ecuații care să exprime cît mai fidel inhibiția prin substrat. Cea mai simplă ecuație adaptată care corelează viteza de consum a substratului cu multiplicarea microorganismului este de forma:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{y}\frac{dX}{dt} \qquad (285)$$

unde: y este coeficientul de conversie a metanolului la biomasă.

5.8.1.2. CINETICA PROCESULUI ÎN SISTEM CONTINUU

În sistem continuu, bioreactorul în care are loc multiplicarea celulelor este alimentat cu un debit constant de mediu nutritiv. Celulele se vor reproduce într-un mediu de volum V, cu un coeficient de creștere, constant, μ. Debitul de biomasă (mediu + celule) se va menține constant, cu ajutorul unui sistem de alimentare-evacuare adecvat. Timpul de staționare într-un asemenea bioreactor alimentat cu un mediu nutritiv la un debit orar W va fi egal cu $\frac{V}{W}$ ore. Inversul acestui timp de staționare, $W/V = D$, se denumește rată de diluție.

S-a menționat că, pentru o cultură aflată în faza de dezvoltare exponențială, creșterea densității microbiene se exprimă prin relația $dX/dt = \mu X$.

Într-o cultură continuă, aportul mediului proaspăt tinde să dilueze cultura și deci să scadă densitatea celulară, ceea ce se exprimă prin relația:

$$-\frac{dX}{dt} = DX \qquad (286)$$

sau

$$\frac{dX}{dt} = -DX. \qquad (287)$$

Combinînd expresia creşterii densităţii celulare cu aceea a efectului de diluţie prin adăugarea mediului, se obţine relaţia :

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) \qquad (288)$$

care exprimă efectul global.

În procesul obţinerii de proteine în flux continuu, se pot ivi următoarele situaţii :

— rata de diluţie (D) mai mare decît rata specifică maximă de creştere (μ_m), adică $D > \mu_m$; în acest caz, raportul dX/dt devine negativ ; concentraţiile celulare (X) vor descreşte, pînă cînd toate celulele vor fi evacuate din bioreactor ;

— rata de diluţie mai mică decît rata specifică maximă de creştere, adică $D < \mu_m$; în acest caz raportul $dX/dt > 0$; concentraţiile celulare au tendinţa să crească ;

— rata de diluţie egală cu rata specifică maximă de creştere, adică $D = \mu_m$; în acest caz, se poate scrie $dX/dt = 0$; concentraţiile celulare devin stabile ; pentru aceasta se reglează aportul mediului nutritiv la o anumită valoare, astfel încît rata de creştere să fie întotdeauna maximă.

În funcţie de condiţiile de cultivare, tulpinile de drojdii sînt inhibate la diferite concentraţii ale substratului metanol. Astfel, cultivată în condiţii de flacoane agitate, *Candida* N-17 are următoarea tendinţă : la concentraţii de metanol rezidual mai mici de 0,5%, viteza de multiplicare (μ) se menţine constantă ; la concentraţii de metanol rezidual mai mari de 0,5%, viteza de multiplicare scade. La cultivarea continuă, viteza de multiplicare scade în cazul în care concentraţiile de metanol rezidual sînt mai mici de 0,03% (Yamauchi, 1979).

Cultivată în bioreactoare Jar de 16 şi 30 l, Kuraishi (1975) constată :

— în cazul în care metanolul rezidual este mai mic de 0,2%

$$(\text{Re MeOH} < 0{,}2\%),\ \mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S};$$

— la concentraţii de metanol mai mari de 0,2% (Re MeOH > 0,2%) $\mu = \alpha \cdot \mu_m \frac{S}{K_s + S}$. În urma studiilor s-a stabilit că valoarea lui α variază invers proporţional cu concentraţia de metanol rezidual.

Rezultate similare s-au obţinut şi în cazul cultivării drojdiei *Candida boidinii* în condiţii de flacoane agitate (Pilat, 1975). Astfel, pentru o concentraţie de metanol rezidual de 0–0,1%, $\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$. Pentru concentraţii de 0,8–3%, μ este constant, iar durata fazei *lag* creşte. Pentru concentraţii mai mari de 3%, μ scade, iar durata fazei *lag* creşte tot mai mult (fig. 139).

Cînd *Torulopsis ernobii* este cultivat într-un bioreactor Jar de 2 l, capacitate, relaţia dintre μ şi S_0 este :

$$\mu = \mu_m \frac{S_0}{K_s + S_0},\ \text{la } 0 < S_0 \leqslant 0{,}5\% \text{ şi}$$

$$\mu = \mu_m \frac{K_t}{K_t - S_0},\ \text{la } 0{,}5 < S_0 \leqslant 4\% \text{ (Elmeyargi, 1977).}$$

Deci, în legătură cu inhibiţia prin substrat, deşi microorganismele şi condiţiile de cultivare sînt diferite, rezultatele sînt similare :

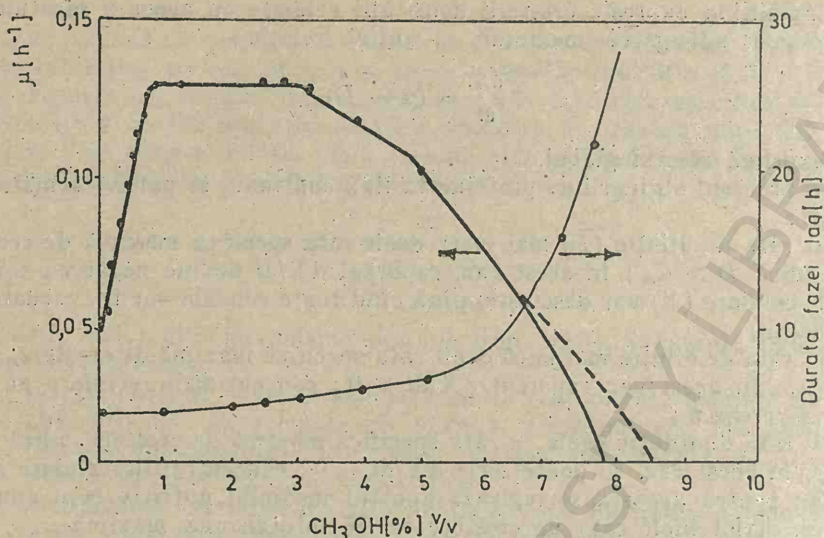


Fig. 139. Efectul concentrației de metanol rezidual asupra ratei specifice de creștere (μ) și duratei fazei lag la *Candida boidinii* (după Pilat, 1975).

— în cazul unor concentrații scăzute de metanol rezidual, viteza de multiplicare crește cu creșterea concentrației metanolului rezidual, conform ecuației lui Monod: $\mu = \mu_m \dfrac{S}{K_s + S}$;

— în cazul unor concentrații mari de metanol rezidual, μ scade o dată cu creșterea concentrației substratului; la concentrații de aproximativ 3% se stabilește inhibiția prin substrat;

— între cele două concentrații există un punct critic (la valori ale metanolului rezidual mai mici de 0,1%) în care productivitatea celulară este mare.

La scară industrială există, de asemenea, pericolul realizării unor concentrații ridicate de metanol rezidual. De aceea, este necesară o alimentare atentă cu metanol, pentru a evita efectul nociv al acestuia. În cazul depășirii limitelor substratului metanol, prin activitatea oxigenului o mare cantitate de metanol este oxidat la formaldehidă. Metabolismul insuficient al formaldehidei duce la acumularea acestuia în cantități mari, ceea ce împiedică multiplicarea microorganimelor.

Pilat (1975) susține că nocivitatea metanolului asupra microorganismelor este de 100 de ori mai mare pentru formaldehidă — prima treaptă de oxidare a metanolului — și de 10 ori mai mare pentru formiat, a doua treaptă de oxidare a metanolului. În fig. 140 este prezentată dependența vitezei specifice de creștere la *Candida boidinii* de concentrația de formaldehidă din mediu (0—0,1% v/v), împreună cu 1% *v/v* metanol rezidual. La *Candida boidinii*, valoarea limită neinhibitorie pentru formaldehidă este de 0,01% O concentrație mai mare produce o inhibiție parțială a creșterii. La concentrații de 0,08% formaldehidă în prezență de 1% metanol are loc o inhibiție totală a multiplicării.

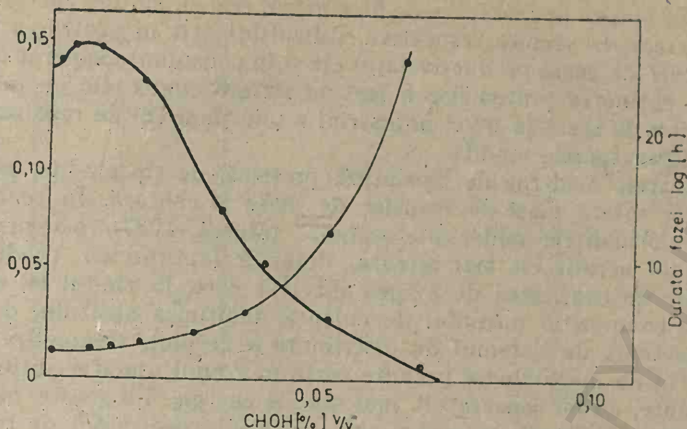


Fig. 140. Dependența vitezei specifice de creștere (μ) de prezența formaldehidei alături de 1% *v/v* metanol la *Candida boidinii* (după Pilat, 1975).

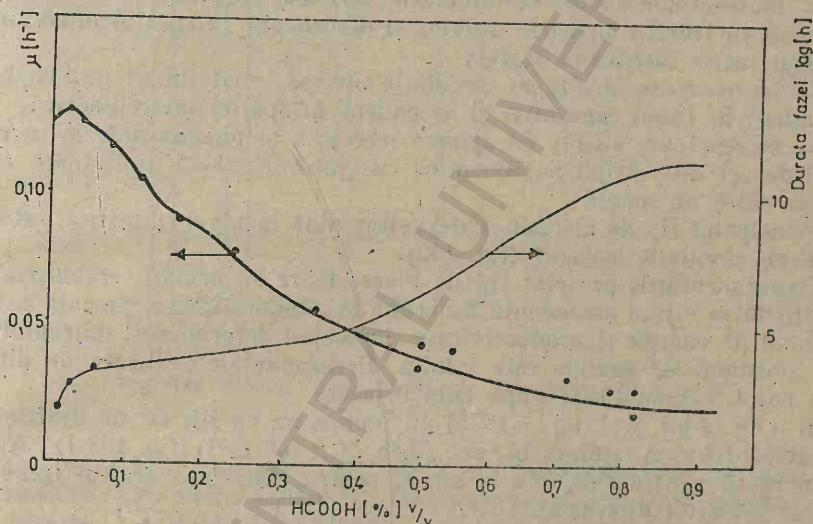


Fig. 141. Dependența vitezei specifice de creștere (μ) de concentrația acidului formic în prezența a 1% *v/v* metanol la *Candida boidinii* (după Pilat, 1975).

În ce privește formiatul, acesta nu poate fi utilizat ca unică sursă de carbon și energie de către *Candida boidinii* 11Bh. La concentrații cuprinse între 0,1–1% *v/v* formiat, creșterea microorganismului nu are loc (fig. 141).

5.9. MODELE DE BIOREACTOARE ÎN FLUX CONTINUU

La obținerea proteinelor în flux continuu, elementele tehnologice deosebit de importante sînt : realizarea unui transfer de oxigen și dioxid de carbon adecvat și asigurarea unei asepsii perfecte într-un interval foarte mare de timp (2–6 luni).

Tipurile clasice de reactoare de biosinteză, cele cu agitare mecanică (Aiba, 1973), au creat, la vremea respectivă, dificultăți atît în păstrarea sterilității (mai ales cele de mare productivitate) cît și în consumul exagerat de energie. De aceea, obținerea proteinelor a fost în strînsă conexiune cu realizarea și apoi ridicarea la scară la nivel industrial a unui nou tip de reactoare de biosinteză, bioreactoarele air-lift.

Reactoarele moderne de biosinteză proteică, de tip air-lift, permit realizarea unor viteze mari de transfer de masă și căldură. În toate studiile privind performanțele noilor bioreactoare (Muscă, 1987), s-a urmărit asigurarea unei aerații cît mai intense, datorită faptului că productivitatea este funcție de cantitatea de oxigen dizolvat care, la rîndul ei, este determinată de compoziția mediului de cultură, înălțimea stratului de lichid și în mod deosebit de sistemul de distribuire a aerului. Geometira deosebită a acestui tip de bioreactoare permite realizarea unui amestec intim între fazele reactante, cu un consum cît mai mic de energie. La aceste bioreactoare gazul și lichidul circulă în echicurent. Omogenizarea masei de reacție este asigurată prin barbotarea unui curent de aer steril, agitarea și aerarea asigurîndu-se astfel simultan.

Bioreactoarele air-lift prezintă o serie de variante :

— bioreactoare air-lift cu circulație normală, cînd fluxul de lichid este ascendent în tubul concentric interior și descendent în spațiul intercilindric (tub concentric interior = draft) ;

— bioreactoare air-lift cu circulație inversă, cînd fluxul de lichid este descendent în tubul concentric și ascendent în spațiul intercilindric ;

— bioreactoare air-lift cu agitare mecanică și pneumatică, în care caz fluxul de aer este dirijat suplimentar, cu ajutorul a 1—2 agitatoare acționate de către un motor.

Principalul tip de bioreactor dezvoltat pînă la nivel industrial este air-lift-ul cu circulație normală (fig. 142).

Experimentările pe acest tip de bioreactoare au urmărit stabilirea unor corelații între viteza ascendentă a aerului și productivitate, precum și între consumul de energie și productivitate, în scopul determinării domeniului în care consumul de energie este minim. Performanțele realizate de diferite firme pot fi exemplificate după cum urmează :

K u r a i s h i și F u j i (1975) au propus un air-lift cu un draft și site din tablă perforată, așezate în turn (0,45 ∅ × 5,6 mH) (fig. 143-1). Autorii consideră că pentru ridicarea la scară, pentru 500 t/an, draftul trebuie să aibă următoarele dimensiuni :

— viteza medie de difuzare — 16,5 kg O_2/m^3·h ;

— viteza de multiplicare — 14,0 kg/m^3·h.

În fig. 143-2 este prezentat un model de instalație cu performanțe de aerare superioare pentru absorbția oxigenului de către cultură. Prin sitele de tablă perforată, curentul de aer care urcă este din nou dispersat, mărind suprafața de contact între lichid și aer. Prin asigurarea unui curent suficient de puternic al lichidului, se împieidcă crearea de diferențe de densitate și, deci, omogenizarea lichidului. Pe lîngă avantajele menționate anterior, instalația prezintă dezavantajul unor dificultăți în realizarea sterilității și întreținerii.

M i n a m i (1978) a propus un air-lift cu un distribuitor de bule și cu agitare (fig. 143-3). În condițiile cultivării în flux continuu la presiune normală, viteza de multiplicare a unei drojdii metilotrofe de proveniență nespecificată a fost de 4 kg/m^3·h.

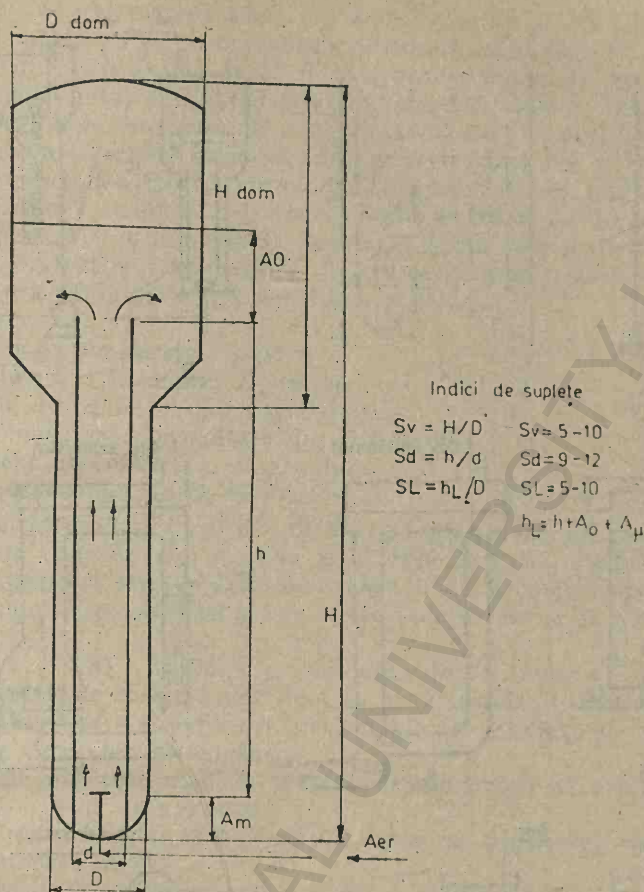


Fig. 142. Schema unui bioreactor Air-lift cu circulaţie normală.

G o t o (1979) a propus (fig. 143-4) un bioreactor turn cu două duze pentru fluid (0,21 mH × 1,05 mH). Presiunea aerului în duză este de 1,2 kg/cm². Sistemul a fost folosit pentru cultivarea unei bacterii metilotrofe, *Methylomonas* sp. C-1012 în flux continuu. Rata de recirculare a fost de 2 500 l/h, iar viteza de înmulţire de 6,93 kg/m³·h.

F a u s t (Uhde-Hoechst, 1977) a folosit un bioreactor cu jet (fig. 143-5). El a efectuat un studiu al ridicării la scară de la 30 l la 3 000 l; după modelul oferit, s-a construit o instalaţie de 50 t/an. Bioreactorul Uhde-Hoechst faţă de cel a lui DIC (Dainippon InK Chemicals) (Suzuki, 1981) prezintă următoarele caracteristici, în ce priveşte difuziunea oxigenului :

	Uhde-Hoechst	DIC
Microorganisme	bacterii	drojdii
Viteza de înmulţire (kg celule/m³·h)	3 – 5	3,4
Randament de bioconversie (%)	<0,5	0,335

Fig. 143. Tipuri de bioreactoare air-lift folosite în obținerea de proteine din metanol.

Viteza de difuziune ($kg\ O_2/m^3 \cdot h$)	4,6–7,7	10,4–10,5
Consumul de oxigen ($kg\ O_2/kg\ O_2$ furnizat)	>0,25	0,14

În cazul lui Uhde-Hoechst, eficiența consumului de oxigen este mai slabă, dar necesară pentru realizarea unui randament de bioconversie mai bun.

M i u r a (1978) a studiat un fermentator turn cu circulație exterioară (fig. 143-6). Productivitatea realizată a fost de 9,3 $kg/m^3 \cdot h$. Comparativ, productivitatea într-un bioreactor Jar a fost numai 1,8 $Jkg/m^3 \cdot h$. După

G o t o (1979), cauza acestei scăderi a productivității poate fi pusă pe seama faptului că dispozitivul nu poate realiza o difuziune satisfăcătoare a oxigenului.

G o w (I.C.L.) a propus în 1979 un tip asemănător de bioreactor (fig. 143-7). Productivitatea instalației pilot realizată (înălțimea turnului 30 m) a fost de 7 kg/m³·h. În partea de coborîre a coloanei de lichid, deficitul de aerare s-a îmbunătățit prin creșterea ratei de recirculare, iar în partea ascendentă s-a introdus un dispozitiv de spargere a bulelor de aer, ducînd la viteză mare de difuziune a aerului. I.C.I. a mai propus un tip de air-lift cu înălțimea turnului de peste 100 m (fig. 143-8). Aeratorul de tip concentric se aseamănă ca formă cu draftul bioreactorului D.I.C. Aceasta face posibilă comparația între datele din catalog ale firmelor I.C.I. și D.I.C. :

	ICI	DIC
Viteza liniară de aerare U_g (m/s)	0,15	1,11
Viteza liniară a lichidului U_1 (m/s)	1—2	1,4
Viteza de difuziune dO_2/dt (kg O_2/m³·h)	>3	2,9
Energie consumată pe unitate (kg O_2/kW·h)	>6	3,4
Randament de consum al oxigenului (kg O_2 consumat/kg O_2 furnizat)	0,9	0,12

Diferența dintre U_b, U_1 și dO_2/dt nu este mare ; energia consumată pe unitate este de două ori mai mare la I.C.I. față de D.I.C. Randamentul de consum al oxigenului este de 7 ori mai mare la I.C.I. comparativ cu D.I.C. Aceasta depinde de poziția spărgătorului de bule de aer și de adîncimea lichidului.

M a r w i l (1978) a inventat o instalație-tub de aerare cu un agitator (fig. 143-9). Tubul de aerare a fost fixat în instalația de absorbție a aerului. În tubul de absorbție s-a realizat o spargere eficace a bulelor de aer precum și reutilizarea excesului de oxigen.

Rezultatele obținute pînă în prezent demonstrează că aceste bioreactoare prezintă o serie de avantaje :

— construcție simplă, fără presetupă, ceea ce micșorează riscul contaminării cu alți germeni ;
— fenomene de spumare mult mai bine stăpînite ;
— consumuri mai scăzute de energie ;
— distribuție uniformă a componentelor de mediu ;
— transfer specific de căldură mai ridicat ;
— utilizare mai rațională a substratului ;

Cercetările pentru perfecționarea lor continuă.

Experiența celei mai rentabile tehnologii din lume (I.C.I.) demonstrează, o dată în plus, că uzina producătoare trebuie construită pe baza caracteristicilor microorganismului cultivat în masă și nu invers (Sasson, 1988).

Datorită performanțelor realizate, bioreactoarele air-lift au început să fie aplicate treptat și în alte procese de biosinteză în afara celor de obținere de proteine, care le-au consacrat (Muscă, 1987).

5.10. MODEL MATEMATIC PENTRU CALCULUL CORELAȚIILOR FUNDAMENTALE LA OBȚINEREA DE PROTEINE DIN METANOL

Orice analiză modernă a proceselor tehnologice implică o formă de modelare matematică (Troie, 1979). În cazul obținerii proteinelor din metanol, modelul matematic poate fi folosit pentru conducerea automată a biopro-

cesului în condițiile unei cultivări continue și pentru obținerea unor date în vederea îmbunătățirii geometriei bioreactorului.

Modelul matematic, fiind o descriere teoretică formală a sistemului real, este definit, atît din punct de vedere al datelor de intrare-ieșire cît și al comportamentului în diverse situații, cu ajutorul unui aparat matematic, care, cu cît este mai complex și mai nuanțat cu atît modelul matematic este mai bun, se apropie mai mult de procesul real.

De obicei, apare un conflict între valoarea mare de informații, de intrare-ieșire și precizia ridicată cerută de determinarea comportamentului sistemului. De asemenea, un număr mare de operații determină un timp de răspuns al modelului matematic inferior timpului de reacție al sistemului real.

Deci, un model matematic se exprimă printr-o relație sau sistem de relații existente între variabilele semnificative ale procesului modelat, însoțite de unele restricții cu privire la valorile acestor variabile (restricții impuse din considerații de capacitate fzică, rezistență mecanică, labilitate, securitate etc.).

Un proces de biosinteză a unui singur produs (categorie în care intră și obținerea proteinelor din metanol) poate fi reprezentat ca o „cutie neagră" (fig. 144) în care la intrare se găsesc variabilele de stare X_1, $X_2 \ldots X_n$, iar la ieșire apare produsul P_1, din exterior acționînd factorii perturbatori ai mediului ambiant (caracterizat cel mai bine de modelul matematic optim).

S-a considerat că, la obținerea de proteine în flux continuu într-un bioreactor tip aer-lift, variabilele de stare dependente de timp sînt următoarele :

$X_1(t)$: concentrația de metanol (substrat) ;

$X_2(t)$: rata de diluție ;

$X_3(t)$: gradul de saturare cu oxigen, la intrare, iar la ieșire $P(t)$: concentrația de biomasă.

În spațiul R^3 al variabilelor de stare există o regiune $E = \{X_1,\ X_2,\ X_3\}$ denumită regiune experimentală unde :

X_1 g/100 ml $\in (0{,}01 - 0{,}5)$

X_2 $h^{-1} \in (0{,}05 - 0{,}15)$

X_3% $\in (5 - 90\%)$

P g/l $\in (0 - 25)$.

Realitatea fizică implică o dependență $P(t) = f\,[X_1(t),\ X_2(t) \ldots X_n(t)]$, deci, determinarea produsului P este funcție de evoluția în timp a variabilelor de stare. În cazul de față, fiind dată evoluția în timp a variabilelor de stare (semnalelor de intrare) și a produsului (semnal de ieșire), se pune problema determinării ecuațiilor care descriu comportarea sistemului.

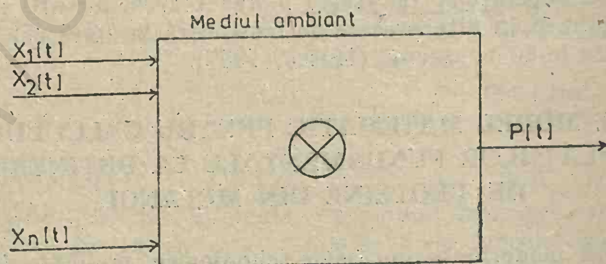


Fig. 144. Reprezentarea unui model matematic al procesului de obținere a proteinei din drojdii pe metanol (cutie neagră).

Din modelul fenomenologic rezultă că modelul matematic este dat de o dependenţă de tipul :

$$P = f_1(X_1, X_2, X_3) ; \quad (289)$$

$$\mu = \frac{1}{P} ; \quad (290)$$

$$\frac{dP}{dt} = f_2(X_1, X_2, X_3), \quad (291)$$

unde μ este rata specifică de creştere a culturii.

Modelul matematic ales (Miron, 1987) este un model neliniar, statistico-matematic unde s-au folosit ca polinoame de aproximare a funcţiilor f_1 şi f_2 polinoame de gradul doi de forma :

$$P = a_1x_1^2 + a_2x_2^2 + a_3x_3^3 ; \quad (292)$$

$$\mu = a_4x_1^2 + a_5x_2^2 + a_6x_3^2. \quad (293)$$

Modelul matematic găsit poate fi utilizat la simularea bioprocesului pe calculator, la îmbunătăţirea formei constructive a bioprocesului etc. El trebuie verificat, corectat şi îmbogăţit astfel încît să se poată stabili valorile parametrilor de stare ce determină o viteză maximă de creştere a biomasei.

5.11. CALITATEA PRODUSULUI

Calitatea biomasei produse de drojdiile metilotrofe este apreciată după criteriile Comisiei pentru Fermentaţie de pe lîngă Uniunea Internaţională pentru Chimie Pură şi Aplicată (I.M.P.A.C. International Union for Pure and Applical Chemistry). Criteriile şi recomandările I.U.P.A.C. au fost date publicităţi în lucrarea intitulată „Surse proteice pentru hrana animalelor“ (Anonymous, 1979). În plus, Grupul de Avizare a Proteinelor de pe lîngă F.A.O. a elaborat o serie de recomandări suplimentare pentru proteinele neconvenţionale destinate alimentaţiei umane.

Recomandătile I.U.P.A.C. referitoare la proteinele neconvenţionale, folosite ca aditivi furajeri includ :

— analiza materiilor prime ;
— analiza produsului finit ;
— teste toxicologice şi nutriţionale ale produsului finit ;
— proprietăţile fizice ale produsului finit ;
— măsuri de depozitare a produsului finit ;
— aspecte legate de încrederea cumpărătorilor faţă de acest tip de produse.

5.12. ANALIZA MATERIILOR PRIME

Analiza metanolului. Metanolul este, în general, o substanţă chimică, destul de pură. Cu toate acestea, impurităţile sînt întotdeauna prezente, iar concentraţia lor poate varia considerabil.

Microorganismele cultivate pe substrat metanol nu pot metaboliza impurităţile substratului ; cu toate acestea, ele sînt adsorbite pe suprafaţa celulelor şi sînt îndepărtate în timpul procesului de uscare, avînd un punct de fierbere scăzut. În tabelul 87 sînt prezentate date analitice tipice ale metanolului pur şi tehnic.

Analize tipice ale metanolului pur şi tehnic
(Dellweg, 1982)

Componentele	Calitatea metanolului	
	Pur	Tehnic
Metanol (%)	99,96	84
Apă (%)	0,012	16
Dimetil eter (ppm)	Nedetectabil	130
Formiat de metil (ppm)	20	200
Acetonă	Urme	Urme
Acetat de metil	Urme	Urme
Etanol (ppm)	30	80
2-Propanol (ppm)	35	150
1-Propanol (ppm)	Nedetectabil	30
2-Butanol (ppm)	15	150
1-Butanol (ppm)	Nedetectabil	30

5.13. ANALIZA PRODUSULUI FINIT (A BIOMASEI PROTEICE)

Pentru a putea fi utilizat ca aditiv furajer, produsul finit este caracterizat prin următoarele analize:

— determinarea umidităţii reziduale, a lipidelor, a proteinelor fibrelor, cenuşei, energiei metabolizate;

— identificarea şi determinarea:

— acizilor graşi, glicerolilor, fosfolipidelor, produşilor nesaponificabili;

— azotului total, azotului aminic, azotului acizilor nucleici, al bazelor purinice şi pirimidinice, al ARN-ului şi ADN-ului;

— macroelementelor (Na, K, Mg, Ca, P, Cl), a microelementelor, în special a acelora de importanţă toxicologică (Pb, Hg, As), sau cu valoare nutritivă (Mn, Zn, Cu, Se, Co, Mo);

— principalilor carbohidraţi;

— vitaminelor solubile şi insolubile în apă;

— metanolului rezidual şi a formaldehidei.

Potrivit recomandărilor I.U.P.A.C., concentraţia metanolului rezidual şi a formaldehidei în biomasa realizată pe metanol nu trebuie să fie mai mare de 20 ppm.

Literatura conţine o mare varietate de analize a biomasei produse de diferite microorganisme crescute pe metanol. Analizînd compoziţia chimică a drojdiei metilotrofe *Candida boidinii*, Sahm şi Wagner (1972) găsesc următoarea compoziţie: 42,81% C, 7,23% H_2 şi 5,54% N_2. La analiza compoziţiei în aminoacizi a biomasei uscate (tabelul 88) se observă o cantitate ridicată de acid glutamic şi acid aspartic, foarte puţină metionină şi relativ multă lizină.

Tabelul 88

Compoziţia în aminoacizi a biomasei uscate de *C. boidinii*

Aminoacizii	g/100 g biomasă uscată	g la 100 g proteină brută	g la 100 g aminoacizi
Acid aspartic	3,25	9,45	12,95
Treonină	1,52	4,42	6,05
Serină	1,39	4,03	5,53
Acid glutamic	3,62	10,45	14,35
Prolină	0,91	2,64	3,61
Glicină	1,28	3,71	5,09
Alanină	1,42	4,12	5,65
Valină	1,58	4,59	6,30
Metionină	0,30	0,86	1,19
Izoleucină	1,37	3,98	5,45
Leucină	1,86	5,39	7,40
Tirozină	0,85	2,46	3,38
Fenilalanină	1,17	3,39	4,65
Histidină	0,63	1,85	2,51
Lizină	2,07	6,01	8,24
Arginină	1,95	5,56	7,75

Rezultatele analizelor produsului finit reflectă proprietăţile genetice ale microorganismelor folosite, condiţiile de cultivare a lor, calităţile reprezentative ale substratului şi ale echipamentului de producţie (Faust, 1983).

În plus, unele procese pentru obţinerea proteinelor de substrat metanol includ şi purificarea biomasei proteice pentru izolarea proteinei de celelalte componente neproteice. Astfel, compoziţia biomasei proteice purificate de Schligmann (1978) este următoarea : 90% aminoacizi, 2% acizi nucleici, 0,5% lipide, 3% carbohidraţi şi 5% minerale. Puritatea acestei proteine precum şi calităţile ei nutritive permit folosirea acesteia în alimentaţia umană.

Teste toxicologice şi nutriţionale ale produsului finit. Biomasa produsă de drojdiile metilotrofe a fost intens testată în experienţe pe termen lung, pe o mare varietate de animale.

Biomasa proteică obţinută din metanol cu ajutorul drojdiilor are un coeficient de digestibilitate ridicat, de peste 90%, fiind mai bun decît al soiei şi orzului. Aceeaşi remarcă este valabilă şi în cazul valorii nutritive (Schulz, 1982).

În concluzie, proteinele obţinute industrial din drojdii metilotrofe au fost declarate „demne de încredere“ în ce priveşte administrarea lor în hrana animalelor. Calitatea lor depinde de procesul de producţie şi este comparabilă cu cea a proteinelor din soia, făină de peşte şi cazeină.

Într-un număr de ţări industrializate, în special în vestul Europei, ele sînt legal permise şi înregistrate ca surse de hrană animală (Faust, 1983).

5.14. RANDAMENT ŞI PRODUCTIVITATE

5.14.1. RANDAMENTUL ÎN PRODUCŢIA DE BIOMASĂ

Creşterea drojdiilor metilotrofe pe substrat metanol este caracterizată printr-un mare număr de valori particulare pentru acest proces, cum ar fi :

— compoziţia mediului de cultură ;

— temperatura (°C) ;
— pH-ul ;
— concentraţia substratului metanol (g%) ;
— rata de diluţie (h^{-1}) ;
— rata specifică maximă de creştere (h^{-1}) ;
— timpul de staţionare (h) ;
— timpul de dublare a concentraţiei de celule (h) ;
— rata de transfer a oxigenului ($kgh^{-1}m^{-3}$) ;
— rata de aerare ($ll^{-1}min^{-1}$) ;
— concentraţia celulară uscată (gl^{-1}) ;
— conţinutul în azot (g)% ;
— conţinutul în acizi nucleici (g%) ;
— conţinutul proteinei în aminoacizi (g%) ;
— consumul specific de metanol, materii prime ;
— volumul de reacţie (m^3) ;
— randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă (%) ;
— productivitatea celulelor ($gl^{-1}h^{-1}$) ;
— eficienţa utilizării substratului metanol.

Valoarea medie a unora dintre parametri este prezentată în tabelul 89.

Tabelul 89

Valoarea medie a parametrilor pentru producţia de proteine din metanol cu drojdii (după Faust, 1983)

Parametrii	Valoare
Compoziţia mediului	Conf. tabelului 84
Temperatură, °C	30
pH	4,5
Rată de diluţie (h^{-1})	0,15—0,2
Timp de dublare (h)	5—7
Rată de transfer a oxigenului ($kgh^{-1}m^{-3}$)	6
Densitate celulară (gl^{-2})	20—25
Productivitate ($gl^{-1}h^{-1}$)	2—4

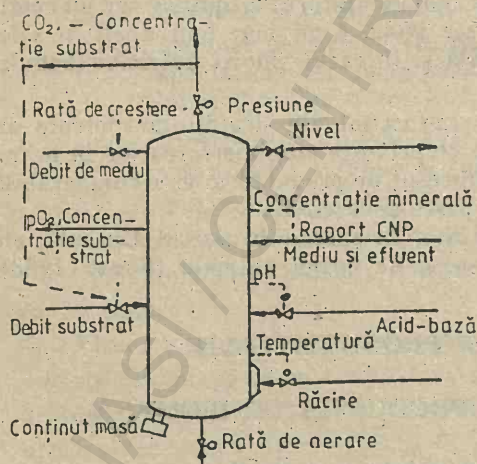


Fig. 145. Parametrii de control a procesului de obţinere de proteine din metanol (după Faust, 1983).

Parametrii de control ai procesului de obţinere de proteine din metanol cu drojdii sînt prezentaţi în fig. 145.

Printre parametrii enumeraţi, o importanţă deosebită pentru bioingineric o are randamentul de bioconversie a metanolului la biomasă. Acest factor defineşte costul substratului metanol în procesul de obţinere de proteine şi, deci, costul produsului finit.

La drojdiile metilotrofe, randamentul biomasei faţă de substratul metanol este de 36—40% (Faust, 1983).

5.14.2. PRODUCTIVITATEA CELULARĂ

Din punct de vedere economic, indicele cel mai important în culturile de organisme unicelulare îl constituie productivitatea, adică masa de celule uscate obținute pe unitatea de volum de cultură în unitatea de timp. Pe baza cercetărilor efectuate de diferiți autori, rezultă că productivitatea celulară este mai mare pentru un microorganism în sistem continuu, față de același microorganism în sistem discontinuu (Harrison, 1976; Warzywada 1978; Minami, 1978; Bayer, 1987; Kapultsevich, 1987; Shulgaskaya, 1987).

Astfel, în cazul folosirii alcoolului metilic, productivitatea celulară crește de la 2,50 $g\,l^{-1}h^{-1}$ în proces discontinuu, la 6,75 $gl^{-1}h^{-1}$, în flux continuu (Anghelache, 1978). În flux continuu, productivitatea celulară se calculează după formula (Harrison, 1976).

$$P = DX = \mu X$$

unde: P este productivitatea ($gl^{-1}h^{-1}$);
D — rata de diluție (h^{-1});
μ — rata specifică de creștere (h^{-1});
X — concentrația celulară (gl^{-1}).

În fig. 146 este prezentată dependența productivității celulare și a cantității produsului de rata de diluție și biomasa acumulată.

Literatura de specialitate menționează pentru drojdiile metilotrofe o productivitate celulară de 2—4 $gl^{-1}h^{-1}$ (Faust, 1983).

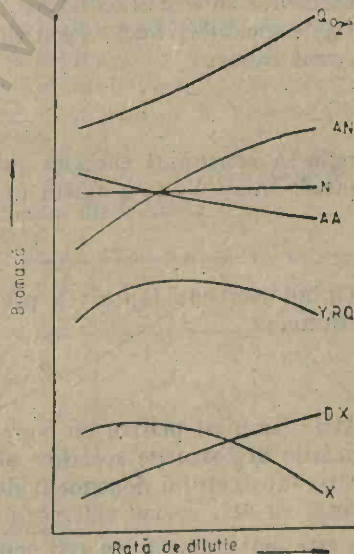


Fig. 146. Dependența productivității celulare și a calității produsului finit de rata de diluție și biomasa acumulată (după Faust, 1983): $Q_{O_2,S}$ — rata de consum O_2 și substrat; AN — acizi nucleici; N — conținutul în azot; AA — conținutul proteinei în aminoacizi; Y — randamentul substratului; RQ — coeficientul de respirație; DX — productivitate; X — concentrația celulară uscată.

5.14.3. EFICIENȚA UTILIZĂRII SUBSTRATULUI METANOL

Un alt factor important cu pondere în prețul de cost al produsului îl constituie eficiența utilizării substratului metanol de către drojdiile metilotrofe, adică randmentul în biomasă față de unități de greutate ale substratului, respectiv carbon și hidrogen. Cu toate că în cursul procesului de obținere de proteine din metanol nu numai carbonul ci și hidrogenul prezent în substrat este oxidat, se consideră mai adecvat calculul randamentului față de carbonul utilizat. În acest sens, Eroshin (1974) arată că energia din substratul folosit transferată energiei biomasei caracterizează mai bine eficiența utilizării substratului metanol. Această valoare a fost definită ca grad de reducere a carbonului din substrat și a fost notată cu γ_s.

γ_s indică numărul de electroni calculați pentru un atom de carbon care pot fi transferați oxigenului prin oxidarea substratului la apă și dioxid de carbon. Notînd cu η efi-

cienţa utilizării energiei substratului pentru obţinerea biomasei şi cu M costul materiei prime, se poate calcula costul materiei prime necesare pentru obţinerea unei tone de biomasă, după relaţia :

$$\frac{2M}{\gamma_{ss}\sigma_n n} \qquad (294)$$

unde : σ_s este partea de greutate a carbonului faţă de greutatea totală a substratului.

Conform relaţiei, o creştere a lui η duce la descreşterea cheltuielilor pentru materiile prime.

Oxidarea substratului metanol are loc în prezenţa oxigenului din aer. De aceea, costul procesului de cultivare, în special al aerului, constituie un alt factor important în producţia industrială de biomasă din drojdii metilotrofe. Întrucît în bioreactoarele industriale oxigenul limitează creşterea, cantitatea de biomasă acumulată este direct proporţională cu randamentul de biomasă calculat pe unitatea de oxigen utilizat de către celule. Notînd aceasta cu Y_0, se indică ce cantitate de biomasă rezultă dintr-o tonă de oxigen utilizat de către celule.

În procesele de oxidare microbiologică aerobă, ca rezultat al transferului de electroni la atomii de oxigen, apare producerea de căldură. În general, producerea de biomasă este direct proporţională cu cantitatea de oxigen folosită. Preţul răcirii, aerării, agitării apei, al salariilor, trebuie incluse de asemenea în costul cultivării. Dacă notăm aceste preţuri cu Φ, găsim că preţurile specifice, deci costul cultivării unei tone de biomasă este egal cu Φ/Y_0. Acest raport :

$$Z = \frac{\Phi}{Y_0} \qquad (295)$$

reflectă consumul energiei substratului pentru obţinerea unei tone de biomasă. Între Y_0 şi η există următoarea relaţie (Minkievich, 1973) :

$$Y_0 = \frac{0,777\eta}{1-\eta} \qquad (296)$$

Ţinînd cont de faptul că preţurile specifice cultivării sînt egale cu $\varnothing/Y_0$, obţinem :

$$Z = \frac{(1-\eta)}{0,777\eta} = 1,3\,\frac{1-\eta}{\eta}\,. \qquad (297)$$

Atîta timp cît pentru un bioreactor dat $1,3\varnothing$ este o valoare constantă, modificările în costurile specifice ale cultivării sînt determinate de eficienţa utilizării substratului dependent de $(1-\eta)/\eta$. Cu cît valoarea lui η este mai scăzută, cu atît costul cultivării este mai ridicat (fig. 146). Cu cît valoarea lui η este mai ridicată, cu atît concentraţia de biomasă obţinută în flux continuu este mai mare. Aceasta ne permite să scădem atît consumul specific de apă cît şi costul separării biomasei. Acest lucru este important, ţinînd cont de faptul că bioprocesul de obţinere de proteine se realizează în soluţii apoase relativ diluate, iar consumul de apă în industria microbiologică este destul de ridicat. Creşterea lui η ajută la combaterea acestui fenomen.

Însumînd costurile specifice ale materiilor prime şi ale cultivării obţinem :

$$\frac{2M}{\gamma_s\sigma_s}\cdot\frac{1}{\eta} + 1,3\Phi\,\frac{1-\eta}{\eta} \qquad (298)$$

Această formulă permite compararea costurilor parametrilor dați cu creșterea celulară pe diferite substraturi, adică, costul exploatării bioreactorului exprimat în cost al oxigenului.

Eficiența utilizării energiei substratului (η) trebuie luată în considerare atunci cînd se studiază mutantele înalt producătoare, deoarece selecția la drojdiile metilotrofe poate să ducă la izolarea unor culturi cu creșterea rapidă dar care să nu posede o valoare η ridicată.

5.15. CONSIDERAȚII ECONOMICE

Deși toate aspectele de siguranță a produselor comercializate au fost examinate în experiențe pe termen lung, iar cîteva produse au primit avizul de utilizare (Anonymous, 1979), procesele de obținere de proteine folosind materii prme sintetice nu au găsit în general accepția economică în vestul europei și în S.U.A. Chiar în cazul folosirii substanțelor ieftine, cum sînt metanul și metanolul, nu a fost posibilă comercializarea produselor, din cauza prețului scăzut de pe piață al făinii de soia.

Dezvoltarea în ultimul timp a unor procese de obținere de proteine proprii a făcut ca biomasa proteică din metanol și metan să poată rivaliza cu făina de soia — sursa cea mai ieftină de proteine — ca și cu proteinele funcționale, cum ar fi cazeina și albumina.

Comparîndu-se diferite surse proteice s-a constatat că alături de proteinele din carbohidrați și deșeuri celulozice, proteinele obținute din metan și metanol au costurile de producție cele mai scăzute.

După Hepner (1982), factorii de cost în producția de proteine din metanol sînt: substratul, investiția și energia (tabelul 90). Prin uramre,

Tabelul 90

Factori de cost în producția de proteine din metanol
(după Hepner, 1982)

Categoria	%, din costul total
Energie	17
Personal, întreținere, cheltuieli	9
Investiție	28
Materii prime	46
Metanol	35
Amoniac	4
Acid fosforic	5
Altele (K,$^{+}$ Mg^{2+}, Fe^{2+})	2

în cazul metanului și în special al metanolului, costul relativ ridicat al substratului impune utilizarea lui avantajoasă din punct de vedere economic precum și un preț scăzut al depozitării biomasei proteice obținute.

Sursele proteice agricole au un conținut proteic mai scăzut decît proteinele obținute cu ajutorul microorganismelor și nu pot satisface în totalitate necesitățile de hrană mereu crescute ale populației. În aceste condiții, se întrevede că acoperirea necesarului de proteine se va putea realiza atît prin dezvoltarea resurselor tradiționale bazate pe agricultură, zootehnie, piscicultură, cît și prin dezvoltarea, în continuare, a producției industriale de proteine bazate pe procese biochimice.

5.16. EXEMPLE DE PROCESE

Ideea de a obține la scară industrială proteine de uz zootehnic (aditivi furajeri) a rezistat probei timpului. Astfel, către sfîrșitul anului 1950, firma British Petroleum a manifestat interes pentru producerea de proteine din hidrocarburi, realizînd concomitent deparafinarea motorinei. Uzina din Lavéra, construită în acest sens, dispune, în 1976, de o capacitate de producție de 20 000 t pe an. Reprofilată pentru creșterea drojdiilor pe *n*-parafine, această tehnologie a suferit fluctuații de interes, de la o țară la alta, în funcție de disponibilitățile de petrol și de situația agricolă (Sasson, 1988).

Revenite în actualitate datorită succeselor obținute de unele industrii din Germania (Uhde, Hoechst) și Marea Britanie (Imperial Chemical Industries, I.C.I.) cu proteinele obținute prin cultivarea bacteriei *Methylomonas* pe metanol, aceste preocupări sînt orientate în prezent spre găsirea de microorganisme și tehnologii capabile să valorifice numeroasele substraturi și reziduuri menționate anterior. Se consideră că, din punct de vedere economic, procedeul pus la punct de către I.C.I. este cel mai rentabil (1988).

Procedeul studiat de Kuaishi (Mitsubischi Gaz Chemical Co. Inc. 1979) a fost stabilit pe o unitate pilot avînd o capacitate de 100 t/an. Bioprocesul se desfășoară în bioreactoare de tip air-lift, prin cultivarea în flux continuu a drojdiilor *Pichia aganobii* Y-1023 și *Hansenula polymorpha* V-32.

Folosind rezultatele obținute la nivel pilot, s-a efectuat o ridicare la scară pentru o capacitate de 60 000—100 000 t/an.

Proteine prin biosinteză se obțin la scară industrială în Japonia, S.U.A., Rusia, China, Cehia, iar la faza pilot sau laborator în numeroase alte țări (Anghelache, 1978).

În țara noastră, procedeul de obținere de proteine din metanol cu ajutorul drojdiilor a fost stabilit de către Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice București în anul 1987, la nivel pilot industrial, pe instalația existentă la Întreprinderea de Bioproteine Curtea de Argeș. Acest procedeu constă în cultivarea drojdiilor metilotrofe în flux continuu, într-un bioreactor de tip air-lift. Biomasa realizată cu drojdii metilotrofe din colecția institutului a fost testată pe animale, în vederea stabilirii valorii nutritive și a efectului bioproductiv al produsului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ABE S., YUKITE Y. *Chemicals by enzymatic and microbial processes. Recent advances,* sub rdd. J. I. DUFFY, 1980, 355—356.
2. ABRAMOVA M. A., KAPULTSEVICH YU. În: Mikrobiologiya, 55, *5*, 1986, 760—764.
3. AIBA S. *Biochemical engineering,* Academic Press, New York, 1973.
4. ALAMYAE T. O., TENGYOSKH KH., SOOM YA. O., SIMISKER YA. A. În: Mikrobiologiya, 54, *4*, 1985, 634—640.
5. ANGHEL I., HERLEA V., TOMA N. *Drojdiile.* Editura Academiei R.S.R. București, 1984.
6. ANGHEL I., TOMA N., VOICA C., COJOCARU I. *Biologia și tehnologia drojdiilor* vol. I. Editura Tehnică, București, 1989.
7. ANGHELACHE I. *Obținerea proteinelor prin biosinteză din materii prime petrochimice.* Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1978.
8. ANONYMOUS. În: Pure and Applical Chemistry, 51, 2537—2560.
9. ASTHANA H., HUMPHREY A. E., MORITZ V. În: Biotechnology and bioengineering, XIII, *6*, 1971, 923—928.

10. BANU C., PREDA N., VASU S. S. *Produsele alimentare și inocuitatea lor.* Editura Tehnică, București, 1982.
11. BAYER M. V., POLANUEK B. M., KAPULTSEVICH YU. G. În: Mikrobiologiya, 56, *1*, 1987, 157—159.
12. BAYER M. V., KAPULTSEVICH YU. G. În: Mikrobiologiya, 56, *4*, 1987, 570—577.
13. BEECH F. W., DAVENPORT R. R. *Methods microbiology*, IV, sub red. BOOTH, Academic Press. London. New York, 1971, 172.
14. CERCEL M., BOLTAȘU Gl, SĂSĂRMAN E., în Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 40, *3*, 1981, 217—223.
15. CERCEL M., SĂSĂRMAN E., GHIOCEL R., MARINESCU M. În: IV International conference on culture collections, Brno, Czechoslovakia 1981, 14.
16. CERCEL M., DIMOV-VASSU T., SĂSĂRMAN E., OLTEANU V., NEGOESCU I. În: Lucrările celui de al treilea simpozion de microbiologie industrială, 1982, 353—359.
17. CERCEL M., VAMANU A., GHIOCEL R., CODIȚĂ I., ENACHE A., BUTNARU A. În: Lucrările celui de-al patrulea simpozion de microbiologie industrială, 1983, 193—198.
18. CERCEL M., JURUBIȚĂ S., SĂSĂRMAN E., NEGOESCU I., BOLTAȘU G., VAMANU A., GHIOCEL R., ENACHE A., BUTNARU A. În: Simpozionul „35 de ani de activitate a ICCF", București, 1984.
19. CERCEL M., VAMANU A., OLTEANU V., CHISACOFF I., MIRON N., CIOCÎRLAN R. În: 4[th] Symposium of the socialist countries on biotechnology, 1986, 147.
20. CERCEL M., VAMANU A., MIRON N., GHINEA S., OLTEANU V., GHIOCEL R. În: Simpozionul național de comunicări tehnico-științifice, București, 1987.
21. CHAMPAGNAT A., ADRIAN J. *Pétrole et protéines,* sub red. DOIN, Paris, 1974.
22. DAMJANOVIC V., RADULOVIC D., în Cryobiology, 5, *2*, 1968, 101—105.
23. DELLWEG H. *Mikrobiell proteingewinnung und biotechnologie. 2 Symp.*, Verlag Chemie Weinheim, 1982, 129—136.
24. DIJKEN J. P., VEENHUIS M. HARDER W. În: Fifth international fermentation symposium, Berlin, 1976, 387.
25. ELMEYARGI H., COFFARO D., în J. Ferment. Technol., 55, 1977, 581.
26. EROSHIN V. K. În: Biotechnology and bioengineering, 4, 1974, 995—1001.
27. FASELLA P., AGOSTINELLI F., Genetic engineering, Sapere, 1981, 26—35.
28. FAUST U., PRAVE P., SUKATSEH D. Al În: J. Ferment. Technol., 55, *6*, 1977, 609—614.
29. FAUST U., PRAVE P. *Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 volumes,* sub red. H.J. REHM, 3, Verlag Chemie, 1983, 83—108.
30. GARRET E. R. CASPER R. În: J. Amer. Pharm. Assoc., 44, n, 1955, 515.
31. GOTO S. În: J. Ferment. Technol., 57, 1979, 341.
32. GOW J. S. În: Single cell protein, Ir, 1979, 370.
33. HARRISON D. E. F. În: Chemical technology, 6, 1976, 570—574.
34. HEPNER L. *Handbuch der biotechnologie,* Akademische verlagsgesell-Schoft, Wiesbaden, 1982, 555—565.
35. HILL G. A., CAMPBELL W. R. În: Biotechnology and bioengineering, XVI, 1974, 551—558.
36. ILCHENKO A. P., KUVICHKINA Tl N., ADANIN V. M., ARIPOVSKY A. V. În: Mikrobiologiya, 56, *4*, 1987, 578—581.
37. KUPLETSKAYA M. B. În: Microbiologiya, 56, *3*, 1987, 488—491.
38. KAPULTSEVICH YU. G., BAYEV M. V., SIMISKER YA. A., KYIVEAR R. K. În: Mikrobiologiya, 56, *1*, 1987, 71—77.
39. KIKUCHI M. În: Biotechnology and bioengineering, XXII, Suppl. 1, 1980, 195—208.
40. KISHELOV A. V., NESTEROVA I. În: Mikrobiologiya, 56, *3*, 1987. 492—496.
41. KURAISHI M., FUJII T. În: Microbiol growth on C_1-compounds, 1975, 231.
42. LEDEBOER A. M., EDENS L., MAAT J., VISSER C., BOS W., VERRIPS C. T., JANOWIEZ Zl, ECKART M., ROGGENKAMP R., HOLLENBERG C. P. În: Nucleic Acids Res., 13, *9*, 1985, 3036—3082.
43. LEE J. D., KOMAGATA K. În: J. Gen. Appl. Microbiol., 26, 1980, 133—158.
44. LIROVA S. A., MATVEYEVA N. I., NIKOLAYEV YU. A. în Mikrobiologiya, 56, *4*, 1987, 707—708.
45. LODDER J., *The Yeasts. A taxomic study,* sub. red. J. LODDER, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1970.
46. MINAMI K. În: J. Ferment. Technol., 56, 1978 a, 64.
47. MINAMI K., YAMAMURA M., SHIMIZU S., OGAWA K., SEKINE N. În: J. Ferment. Technol., 56, *1*, 1978 b, 35—40.

48. MINAMI K., YAMAMURA M., SHIMIZU S., OGAWA K., SEKINE N. În: J. Ferment. Technol., 56, *1*, 1978 c, 1–7.
49. MIRON N., VAMANU A., CERCEL M., GHINEA S., OLTEANU V. În: Simpozionul de genetică și inginerie genetică, București, 1987.
50. MITIC S. Vl, DAMJANOVIC V. În: Cryobiology, 11, 1974, 116–120.
51. MIYASAKE Y., CHOKYUN R., APTAONY Jl, SINSKEY. În: Biotechnology and bioengineering, XXII, 1980, 2065–2079.
52. MUȘCĂ G. *Orientări, realizări, tendințe în cercetarea științifică și ingineria tehnologică. Biotehnologie. Aplicații industriale*, INID, București, 1987.
53. MULLER F. În: Fifth international fermentation symposium, Berlin, 1976, 477.
54. NIKOLAYEV A., MATVEYEVA N. I., LIROVA S.A., SOKOLOV D. P., PLAKUNOV V. K. În: Mikrobiologiya, 56, *4*, 1987, 537–542.
55. PEBERDY J. F. În: Enzyme Microb. Technol., 2, 1980.
56. PILAT P., PROKOP A. În Biotechnology and bioengineering, XVII, 1975, 1717–1722.
57. SAHM H., WAGNER F. În: Genetics of industrial microorganisms. Second International Symposium, 1974, 92.
58. SAHM H., DIX B., EGGELING L., ROGGENKAMP R. În: Fifth international fermentation symposium, Berlin, 1976, 389.
59. SAHM H. *Advances in biochemical engineering*, 6, sub red. T.K. GHASE, Sprigger-Verlag, 1977, 77–103.
60. SASSON A. *Biotehnologiile: sfidare și promisiuni.* Editură Tehnică, București, 1988.
61. SAVEHENKO G. V., VIKHAUSKII YU. D., KAPULTSEVICH YU. G. În: Genetika (Moscova), 17, *8*, 1981, 1521–1523.
62. SAVEHENKO G. V., KAPULTSEVICH YU. G., TEMINA A. V., NITITINA I. A. În: Microbiologiya, 52, *3*, 1983, 449–454.
63. SCHLINGMANN M., PROVE P. În: Fette Seifen Austrichm, 80, 1978, 283–286.
64. SCHULZ E. *Mikrobiell proteingewinnung und biotechnologie.* 2 Symp., Verlag Chemie Weinheim, 1982, 225–237.
65. SHERWOOD R., ATKINSON T. În: Chemistry and industry, 1981, 241–247.
66. SIBIRNY A. A., TITORENKO V. I. EFREE+V B. D., TOLSTORUKOV I. I., *Yeast*, 3, 1987, 233–241.
67. SHULGOSKAYA E. M., POZMOGOVA I. N., RABOTNOVA I. L. În: Mikrobiologiya, 56, *4*, 1987, 631–634.
68. SUZUKI Y. În: International symposium on SCP, Paris, 1981, 1–7.
69. TITORENKO V. I., BYKOVSKAYA S. V., TROTSENKO YU. A. În: Mikrobiologiya, 54, *2*, 1983 a, 307–311.
70. TITORENKO V. I., TROTSENKO YU. A. În: Mikrobiologiya, 52, *6*, 1983 b, 979–985.
71. TOPIWALA H. H. În: Microbiol growth on C_1-compounds, 1975, 199–202.
72. TROIE V. *Modele matematice în biomedicină*, Inst. Politehnic București, 1979.
73. TSUTSAYEVA A. A., KAZANSKAYA L. N., BALYBERDINA L. M. MARKOVA V. M., KUDOKOTSEVA O. V., KADNIKOVA N. G. În: Mikrobiologia, 56, *2*, 1987, 338–346.
74. VAMANU A., CERCEL M., OLTEANU V., MIRON N., GHINEA S., ARIZAN R., OLĂRĂSCU N., în Al VI-lea simpozion de microbiologie industrială și biotehnologie, Iași, 1987, 363–366.
75. ZARNEA G. *Tratat de microbiologie generală*, II. Editura Academiei R.S.R., 1984.
76. ZARNEA G. *Revoluția biologică.* Ed. Academiei R.S.R., 1985.
77. WINDASS J. D., WORSEY M. J., PIOLI E. M., PIOLI D., BARTH P. T., ATHERTON K. T., DART E. C. În: Nature, 287, *5781*, 1980, 396–401.
78. QUAYLE R. J., FERENCI T. M. În: Microbiol. Rev., 43, 1978, 251–273.
79. YAMADA H., în Symp. in Canada, 1980, 20–25.

6. TEHNOLOGIA OBȚINERII PROTEINELOR DIN DROJDII PE ETANOL

A. VAMANU

6.1. INTRODUCERE

Alegerea etanolului ca unică sursă de carbon și energie elimină dificultățile legate de producție prin biosinteză a biomasei proteice de uz uman. Etanolul are avantaje nete în comparație cu alte substanțe sumarizate în tabelul 91.

Tabelul 91

Etanolul ca substrat pentru biomasă
(Hamphrey, 1980)

Avantaje
1) Disponibil ca materie foarte pură
2) Acceptabil ca ingredient alimentar
3) Ușor de depozitat și transportat
4) Complet solubil în apă
5) Nu este un inhibitor marcant pentru cele mai multe microorganisme
6) Necesită mai puțin oxigen și eliberează mai puțină căldură decît alte substanțe hidrocarbonate
7) Poate fi obținut în cantități mari din resurse noi
Dezavantaje
1) Costul relativ ridicat de substrat
2) Volatilitate relativ înaltă în soluții diluate
3) Ușor utilizat de multe specii de microorganisme ca sursă de carbon, deci poate fi contaminat

De exemplu, etanolul poate fi produs din cereale și alte resurse noi, ca materie foarte pură. În consecință este acceptabil ca materie primă pentru uz alimentar. El este ușor depozitat și transportat și nu este atît de toxic ca metanolul. Este complet solubil în apă și nu este un inhibitor marcant pentru microorganisme, în special pentru drojdii care pot crește în medii de cultură ce conțin 5—10% etanol. Necesarul de oxigen pentru metabolismul etanolului este destul de mic și eliberează mai puțină căldură decît alte substraturi (hidrocarburi, carbohidrați).

Principalul dezavantaj al folosirii etanolului în producție de biomasă proteică este costul lui ridicat, de aproximativ 2,5 ori mai mare decît în cazul folosirii glucozei (Humphrey, 1980).

Etanolul are o volatilitate relativ ridicată în soluție diluată. Prin urmare, pentru a evita o pierdere apreciabilă prin evaporare, trebuie păstrată o concentrație scăzută în mediul de fermentație. Aceasta poate fi realizată prin utilizarea procesului continuu sau semicontinuu.

Obținerea proteinelor din drojdii pe etanol se operează în condiții aseptice și concentrați limitate de substrat, la o rată de creștere înaltă care să asigure un randament și un conținut proteic maxim în produsul finit.

6.2. MICROORGANISME

În literatura de specialitate sînt multe referințe despre specii de microorganisme care utilizează etanolul ca sursă primară de carbon și energie.

Cele mai multe specii de drojdii aparțin genurilor *Candida* și *Saccharomyces*, deoarece acestea au fost acceptate de către F.A.O. ca ingrediente alimentare (Watteeuw, 1977). Au mai fost testate și specii ale genurilor : *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Lentinus*, *Pichia*, *Rhodotorula*.

6.3. CĂI METABOLICE DE UTILIZARE A ETANOLULUI DE CĂTRE DROJDII

Etanolul este în primul rînd oxidat la acetaldehidă după care urmează a doua oxidare la acetat. Ca rezultat al acestor oxidări, se produc două molecule de NADH pentru fiecare moleculă de etanol.

Acetatul produs se poate acumula ca produs extraceluler sau se poate transforma în acetil, care intră în ciclul acizilor tricarboxilici și evoluează direct la malat. În acest caz majoritatea NADH citoplasmatic este implicat în oxidarea etanolului, deci acest malat este transformat în piruvat cît și în oxaloacetat care necesită NADH (fig. 147).

Este posibil deci, să se observe o creștere a coeficientului respirator în cazul recirculării acetil-CoA în ciclul acizilor tricarboxilici avînd ca efect producerea unei cantități mai mari de CO_2. Aceste relații sînt prezentate în tabelul 92 și determină cinetica și randamentul total care este foarte important pentru optimizarea procesului.

Tabelul 92

Relațiile stoichiometrice în cazul metabolizării etanolului de către drojdii (Hamphrey, 1980)

Stoichimetrie	Coeficient respirator $\frac{\text{moli } CO_2}{\text{moli } O_2}$	Randament $\frac{\text{g celule}}{\text{g etanol}}$
Dezvoltare pe etanol		
$8\ CH_3CH_2OH + 9\ O_2 + 2\ NH_3 \rightarrow 2\ C_7H_{11}NO_3 + 2\ CO_2 + 16\ H_2O$	0,22	0,85
Producere de acetat		
$CH_3CH_2OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$	0,0	0,0
$CH_3CH_2OH + 3O_2 \rightarrow 2\ CO_2 + 3\ H_2O$	0,67	0,0
Dezvoltare pe acetat		
$8\ CH_3COOH + 2\ NH_3 + O_2 \rightarrow 2\ C_7H_{11}NO_3 + 2\ CO_2 + 8\ H_2O$	2,0	0,65
$CH_3COOH + 2\ O_2 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O$	1,0	0,0

În plus, nivelele de NADH descresc o dată cu declinul conversiei de etanol și cresc în consumul extracelular de acetat.

6.4. CINETICA

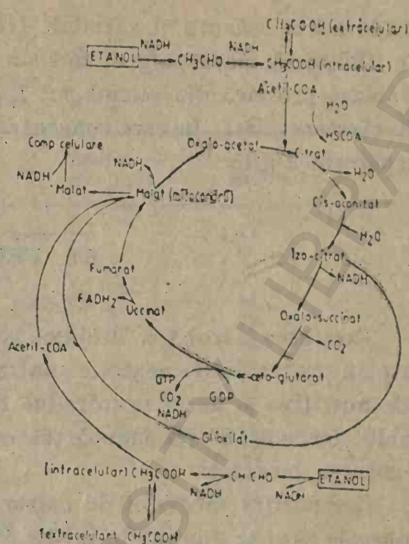


Fig. 147. Căi metabolice de utilizare a etanolului de către drojdii (Humphrey, 1980).

Cîteva studii prezintă cinetica de utilizare aerobă a etanolului de către drojdii ca Mor și Fiechter (1968), Laskin (1977), Ristraph, Watteeuw Armiger și Hamphrey (1977), Prokop, Votruba Sobotka și Panos (1987), Humpgrey (1980). Problema are două aspecte. Mai întîi coeficientul de utilizare a substratului depinde foarte mult de rata de creștere, iar în al doilea rînd, acetaldehida și acidul acetic, care sînt intemediari în metabolismul etanolului, sînt inhibitori ai creșterii. În fermentațiile aerobe cu substrat de etanol, amîndoi compușii se pot acumula cînd etanolul este în exces.

Prokop și colab. (1978) au arătat că rata de creștere a drojdiei *Candida utilis* A-49 este pe jumătate inhibată la concentrația de 0,12 g/l acetaldehidă și 0,0175 g/l acetat.

Tabelul 93 prezintă cîteva valori ale randamentelor tipice obținute cu drojdii pe etanol în condiții limitate și nelimitate de substrat.

Tabelul 93

Randamente în biomasă proteică din etanol
(Humphrey, 1980)

Autori	Biomasă finală (g/l)	Timp (h)	Etanol ca substrat (g/l)	Randament efectiv (g/g)	Randament real $m = 0{,}02$ (g/g)
Etanol limitat					
Ziegler (1979)	41,7	19,5	19,5	0,69	0,73
Prokop (1978)	15	9	20	0,75	0,76
Laskin (1977)	12	12	16	0,75	0,77
Etanol nelimitat					
Watteeuw (1977)	33	35	37,2	0,35	0,38
Laskin (1977)	7	—	—	0,46	—
Mor (1968)	4,7	—	—	0,46	—

Cînd microorganismul este crescut la concentrații scăzute de etanol, poate fi atins un randament de circa 0,75g biomasă/g etanol. Randamentul depinde în special de constanta condițiilor de cultivare și de rata de creștere. Literatura arată că la rate de creștere de 0,25 h^{-1} — 0,35h^{-1}, se obțin rezultate optime. În cazul concentrațiilor ridicate de etanol (4 g/l), se obțin

randamente scăzute și variabile (Humphrey, 1980). Randamentele mai mici de 0,35 g biomasă pe/g etanol nu sînt economice. Randamente înalte în biomasă proteică din etanol pot fi obţinute prin cultivare continuă, la rate de creştere mari, în care concentraţia de etanol din mediul de cultură nu depăşeşte 2 g/l.

6.5. FERMENTAȚIA

Creşterea aerobă a drojdiei selecţionate este efectuată la scară mare, într-un proces de fermentaţie continuă, aseptică, în care substratul, substanţele nutritive şi aerul se introduc continuu într-un bioreactor, în timp ce lichidul fermentat este îndepărtat continuu. Din lichidul fermentat urmează separarea biomasei.

Compoziția mediului de cultură este prezentată în tabelul 94. Sărurile minerale care se adaugă în mediu în cantităţi relativ mari sînt clasificate ca macroelemente, iar cele necesare în cantităţi foarte mici (urme) ca microelemente.

Tabelul 94

Componente anorganice din mediul de fermentație
(Ridgway și colab., 1975)

Elementul nutritiv	Compusul tipic	Limite largi	Concentrații optime
Macroelemente			
Fosfor	H_3PO_4	1—5 g	2—4 g
Potasiu	KCl	1—5 g	2—3 g
Magneziu	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$; $MgSO_4$	0,2—1 g	0,3—0,6 g
Calciu	$CaCl_2$	0,001—1 g	0,001—0,2 g
Sodiu	$Na_2CO_3eH_2O$; NaCl	0,01—1 g	0,01—0,2 g
Microelemente			
Fe	$FeC_3H_4(OH)(COOH)_3$	1—40 mg	6—13 mg
Mn	$MnSO_4eH_2O$	1—20 mg	4—8 mg
Zn	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5—20 mg	2—6 mg
Mo	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,1—10 mg	1—2 mg
Cu	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,01—10 mg	0,5—1 mg

Soluţiile apoase ale componentelor mediului de cultură sînt sterilizate prin încălzire la 120...130°C, înainte de introducerea în fermentator. Temperatura de cultivare este de 30...35°C, iar *p*H-ul se menține între 3,5—5,5, preferabil 4,0, cu amoniac. Atunci cînd se folosește amoniac gazos, acesta este injectat în linia de aer, rata de aerare asigurînd o cantitate de oxigen de 100—140 milimoli/l/oră.

Biomasa se recoltează prin centrifugare şi este uscată prin atomizare.

Compoziţia chimică şi analiza aminoacizilor din produsul finit este prezentată în tabelul 95.

Compoziția chimică și analiza aminoacizilor din biomasa proteică obținută din drojdii pe etanol
(Hitzman, 1984)

Compoziția chimică (%)		Analiza de aminoacizi (g aminoacid/100 g biomasă)	
Azot	8,3	Acid aspartic	4,42
Proteină brută (N × 6,25)	52	Treonină	2,55
		Serină	2,29
Cenușă	8	Acid glutamic	8,48
Lipide	7	Prolină	1,51
Umiditate	7	Glicină	2,24
Minerale		Alanină	2,70
Ca	0,02	Cistină	0,36
P	1,06	Valină	2,76
Mg	0,10	Metionină	0,62
K	2,14	Izoleucină	2,24
Na	0,10	Leucină	3,48
		Tirozină	1,66
		Fenilalanină	2,13
		Histidină	1,09
		Lizină	3,48
		Arginină	2,86
		Triptofan	0,52

6.6. EXEMPLE DE PROCESE

Cîteva proiecte comerciale de obținere a biomasei proteice din drojdii pe etanol sînt prezentate în tabelul 96. În S.U.A., American Oil Company a construit un pilot cu o capacitate de 7,5 t/an în Hutchinson, Minesota, utilizînd drojdia *Torula*. Produsul obținut are denumirea comercială „Torutein" și a fost impus ca ingredient alimentar cu aromă plăcută

Tabelul 96

Proiecte de obținere a biomasei proteice din etanol
(Humphrey, 1980)

Compania	Microorganismul	Capacitate (t/an)
Amoco	*Candida utilis*	7,5
Mitsubishi	*Candida*	100
Slovnaft	Drojdie	1 000, Kojetin Cehia
Institutul de Fermentație Industrială	*Hansenula anomala*	3,5, Spania
Cepso	Drojdii	100 000, Huelvo, Spania
Schick-chemie-technik SmbH	*Hansenula anomala*	100 000, Cologne Germania
vove sta-Phillips	*Candida, Pichia, Hansenula*	—

Altă firmă din S.U.A., Provesta-Philips, a dezvoltat un proces de obținere a biomasei proteice, prin creșterea drojdiilor pe alcooli la concentrații celulare foarte mari (circa 13% substanță uscată) în proces continuu. Mediul

de fermentație nu mai suportă faza de separare a biomasei, ci este pasteurizat și apoi uscat prin atomizare eliminîndu-se astfel posibilitatea de contaminare în faza de prelucrare.

Mitsubishi Petroleum Company din Japonia a crescut o tulpină de *Candida* pe etanol la temperatura de 40°C (Masuda, 1976). Acest proces a fost dezvoltat la scară pilot, avînd o capacitate de 100 t/an.

Dezvoltarea drojdiei la temperatură ridicată are avantajul de a reduce contaminarea și cantitatea de apă de răcire, implicînd deci o reducere a costului de producție.

În Cehia este raportată o capacitate pilot de 1 000 t/an în Kojetin, bazată pe un proces care utilizează drojdii (Laskin, 1977).

În Spania, Institutul de Fermentație Industrială a Centrului superior de cercetări științifice a dezvoltat, cu sprijin guvernamental, un proces de producere de biomasă proteică din etanol utilizînd drojdia *Hansenula anomala* (Humphrey, 1980). Acest proces stă la baza unei tehnologii licențiate pentru 100 000 t/an de către Semie-Technik SmSH Company (R.E.G.).

Alte companii și institute tehnice din fosta U.R.S.S., Germaia și Japonia au patentat procesele de obținere a biomasei proteice pe bază de etanol (Erashin, 1976 ; Lüke, 1976 ; Soto, 1973).

Costul ridicat al energiei și al etanolului derivat din etilenă nu face economic procesul de obținere a biomasei proteice. Prognozele asupra obținerii cantităților mari de etanol din noi resurse mențin etanolul ca un substrat al viitorului în vederea obținerii de proteine, care se vor utiliza direct în alimentația umană.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANGHEL, U., TOMA N., VOICA C., COJOCARU I. *Biologia și tehnologia drojdiilor*. Editura Tehnică, București, 1989.
2. ANGHELACHE I. *Obținerea proteinelor prin biosinteză din materii prime petrochimice*. Editura Științifică și Enciclopedică,, București, 1978.
3. EROSHIN, Y. K., and UTKIN, I. S. În: Proc. V I.F.S. Berlin, Abstract 11.06, 1976, 206.
4. SOTO S., KITAI A., OTAKI A. În: J. Ferment. Technol., 51, 1973, 582.
5. HAMPHREY, A. E. în: ACS Symp. London, July 20–25, 1980.
6. HITZMAN D. O. (Phillips Petroleum Company) U.S. Patent, 3, 642, 578, 1984.
7. LASKIN A. I. În: Biotechnol. Bioenerg. Symp., No. 7, 1977, 91.
8. LUKE C., OELS U., SCHUGERL K. În: Proc. V I.F.S., Berlin (Abstract 1.01), 1976.
9. MASUDA Y., NAKANISHI M., and SAKAKURO Y. În: Hidrocarbon, Proc. 55, 1976, 113.
10. MOR I. R., and FIECHTER A. În: Biotechnol. Bioenerg, 10, 1968, 159.
11. MOR J. R., and FIECHTER A. În: Biotechnol. Bioengrl, 10, 1968, 787.
12. PROKOP A. S., VOTRUBO S., SOBOTKO M., and PANOS J. În: Biotechnol. Bioengr. 20, 1978, 1523.
13. RIDGWAY J. A., LAPPIN T. A., BENJAMIN B. M., CORNS J. B., and ATKIN C., (Standard Oil), U.S. Patent, 3, 865, 691, 1975.
14. RISTROPH D. L., WATEEUW, Cl M., ARMIGER W. B., and HAMPHREY A. E. În: J. Ferment. Technol., 55, 1977, 689.
15. WATTEEUW C. M., ARMIGER W. B., RISTROPH L. D., and HAMPHREY A. E. În 2 and CIS/ACS Joint Conferences (May 29-June 2), Montreal, 1977.